

Tesis doctoral

Características moleculares y funcionales de los receptores solubles del TNF con capacidad anti-quimioquinas de poxvirus.

Sergio Martín Pontejo

Departamento de Biología Molecular de la Universidad
Autónoma de Madrid

Codirectores de Tesis: Dra. Begoña Ruíz Argüello y Dr. Antonio Alcamí

2012





Esta Tesis se ha desarrollado en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa y ha sido financiada por la beca I3P del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Fundación Severo Ochoa. Además se disfrutó de una estancia en la Washington University of Saint Louis (USA) gracias al programa de estancias breves de la beca I3P del CSIC.



Agradecimientos

Se suele sugerir que no conviene mezclar lo profesional con lo personal. Sin embargo, a quienes otros citaron como una inestimable ayuda para llevar a término ciertos proyectos, yo tengo la suerte de deberles en lo personal, tanto o más que en lo profesional. Así que no podré llenar esta página con el clásico "gracias a Pepito por enseñarme a crecer como científico", y por ello, se me hace más complicada la tarea.

Antonio, gracias mil veces (y son pocas) por tu ilimitado apoyo. Es muy agradable saber que puedes contar con quien te manda y ordena. Que me quiero ir de estancia, me voy, que me quiero ir a un congreso a Tombuctú, me voy, que me quiero quedar un año más pero se me acaba la beca, Antonio me financia. Oye Antonio que me van muy bien las cosas en USA y me quiero quedar dos meses más, me financia, ¿quién?, Antonio. Y además, que incluso cuando nadie te lo pidió, aparecieses de nuevo para facilitar que un padre y un amigo fuesen a por un hijo y un amigo en momentos de vital necesidad... Fue en aquella vital necesidad cuando aparecieron muchos otros hombros en los que apoyarme. Quién me iba a decir a mí que Daved, quien al principio sólo me infundía un profundo respeto (y casi miedo), seis meses más tarde lo convertiría en un cariño cercano y gratitud infinita.

Ahora tocaría decir aquello de "y gracias a la gente del laboratorio por apoyarme en los momentos bajos", pero tampoco podré escribir esto aquí. Por fortuna me empecé en compartir con ellos mis momentos altos, los de sonrisa en la boca. Desde luego, he aprendido con ellos, pero eso me lo garantizaban con el contrato, si te rodeas de gente buena, aprendes, aunque sea por ósmosis (Este palabro me lo enseñaron ellos). Lo sorprendente y lo que es de agradecer, es que te puedas levantar cada mañana sabiendo que te vas a un sitio en el que te sientes a gusto. Podré encontrar fácilmente un nuevo destino con un proyecto ambicioso y estimulante, eso está casi en mi mano, pero con lo que sí necesito llamar a la suerte es con los futuros, Ali, Abel, Rocío, Begoña, Imma, Juan, Alberto, Carolina, Elena, Haleh, Nadia, Sole, Carla y Leyre.

Por desgracia o fortuna para ellos, los que sí experimentan mis malos momentos, son mis amores más incondicionales. Honestamente, dudo, pero mucho, que alguien haya podido encontrar un amigo como el que tú eres Rubén. Lealtad, apoyo, comprensión, diversión, todo, absolutamente todo. Y dudo todavía más, porque yo mismo un mes antes lo veía imposible, que alguien esté al lado de otro alguien que le haga tan feliz, le mejore y le complete tanto como tú lo haces conmigo Ángela. Por eso, haré lo que sea para merecerte de por vida.

Con los que sí sé que cuento, los que nunca van a desaparecer aunque yo no me lo merezca son mis padres y hermanos. Estaré todavía un tiempo lejos de ellos, pero seguiré llamándoles desde el pasillo de un edificio en Sri Lanka para decirles que tengo éste o aquel problema, y funcionará, mágicamente colgaré el teléfono y habrán conseguido hacerme sentir mejor: Sabré que siempre podré volver a casa.

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	9
1 INTRODUCCIÓN	13
1.1 Familia viral <i>Poxviridae</i>	15
1.1.1 Genoma	15
1.1.2 Ciclo viral	15
1.1.3 Morfología y estructura	17
1.1.4 Clasificación taxonómica	17
1.1.4.1 VARV	17
1.1.4.2 CPXV, VACV y MPXV	19
1.1.4.3 ECTV	20
1.2 Modulación inmunológica por Poxvirus	21
1.2.1 Mecanismos intracelulares	21
1.2.2 Mecanismos extracelulares	22
1.2.2.1 Inhibición de la respuesta de IFN	22
1.2.2.2 Modulación de la actividad de CKs	23
1.2.2.3 Inhibición de la respuesta del TNF α	26
1.3 Sistema del TNFα y su modulación por poxvirus	27
1.3.1 TNFSFLs y TNFSFRs	27
1.3.1.1 Biología y estructura del TNF α y LT α	28
1.3.1.2 Biología y estructura de los TNFSFRs	29
1.3.2 Modulación viral de la respuesta de los TNFSFLs	31
1.3.2.1 Expresión de vTNFRs	31
1.3.2.2 Expresión de vTNFBPs	33
1.3.3 El TNF α y las CKs en la enfermedad	33
1.4 Inmunopatogénesis de ECTV	35
1.4.1 El modelo de <i>mousepox</i>	35
1.4.2 La respuesta inmunológica frente a ECTV	36
1.4.2.1 Respuesta innata	36
1.4.2.2 Respuesta adaptativa	37
1.4.3 Papel en patogénesis de genes inmunomoduladores de ECTV	38
2 OBJETIVOS	41
3 MATERIALES Y MÉTODOS	45
3.1 Líneas celulares	47
3.2 Virus	47
3.3 Citoquinas	48
3.4 Clonajes	48
3.5 Generación de baculovirus recombinantes	50
3.6 Expresión y purificación de proteínas recombinantes	51

3.7	Ensayos de interacción proteína-proteína	52
3.7.1	Resonancia de los plasmones de superficie (SPR)	52
3.7.2	Geles Nativos	53
3.8	Ensayos de actividad <i>in vitro</i> con proteína recombinante	53
3.8.1	Ensayos de citotoxicidad con TNFSFLs solubles	53
3.8.2	Ensayo de citotoxicidad con tmTNF α	54
3.8.3	Ensayos de señalización reversa mediada por tmTNF α	54
3.8.4	Ensayos de quimiotaxis	54
3.9	Ensayos de unión a GAGs	55
3.9.1	SPR	55
3.9.2	Citometría de flujo	55
3.9.3	Inmunofluorescencia	56
3.9.4	Precipitación con resina de heparina	56
3.10	Generación de ECTV recombinantes	56
3.10.1	Amplificación y semipurificación de ECTV mediante colchón de sacarosa	57
3.11	Ensayos con sobrenadantes de células infectadas con ECTV	58
3.11.1	Infección de células BS-C-1 con ECTV	58
3.11.2	Ensayos de cuantificación de proteína: ELISA y <i>Western Blot</i>	58
3.11.3	Ensayo de citotoxicidad de TNF α	59
3.12	Ensayos <i>in vivo</i> en ratones infectados con ECTV	59
4	RESULTADOS	61
4.1	Caracterización molecular de CrmD	63
4.1.1	Expresión y purificación de CrmD y sus dominios	63
4.1.2	Análisis por SPR de los potenciales ligandos de CrmD	65
4.1.2.1	Unión de TNFSFLs a CrmD	65
4.1.2.2	Unión de CKs a CrmD	66
4.1.2.3	Cálculo de la afinidad de CrmD por sus ligandos	67
4.1.3	Inhibición de la actividad de los TNFSFLs por CrmD	68
4.1.3.1	CrmD inhibe la unión del TNF α a su receptor celular pero no la de APRIL	68
4.1.3.2	CrmD inhibe la citotoxicidad mediada por TNF α , LT α y LT β	69
4.1.3.3	CrmD inhibe la migración inducida por CCL25, CCL27 y CXCL13, pero no la de CXCL12 β	69
4.1.4	CrmD une de manera simultánea TNFSFLs y CKs	70
4.1.5	Caracterización molecular de los dos dominios de CrmD	72
4.1.5.1	Caracterización de las propiedades de unión mediante SPR de los dos dominios de CrmD	72
4.1.5.2	CRD-CrmD y CrmD163 muestran una actividad comparable a CrmD frente al TNF α y las CKs, respectivamente	73
4.2	Análisis por mutagénesis dirigida del dominio de unión a TNF de CrmD	75
4.2.1	Expresión de mutantes en el dominio de unión a TNFSFLs de CrmD	75
4.2.2	Las mutaciones en el dominio anti-TNFSFLs de CrmD no afectan a la capacidad anti-CK de la proteína	76
4.2.3	Caracterización de la unión de TNFSFLs de los mutantes de CrmD	77
4.2.4	Análisis de la actividad anti-TNFSFLs de los mutantes de CrmD	79
4.2.5	CrmD modula la actividad del tmTNF α	80
4.2.5.1	CrmD inhibe la citotoxicidad mediada por el tmTNF α	80
4.2.5.2	Los mutantes de CrmD presentan una actividad frente al tmTNF α comparable a la mostrada frente al sTNF α	81
4.2.5.3	La interacción de CrmD con el tmTNF α reduce la producción de sTNF	82

4.3	Estudio de las propiedades de los distintos vTNFRs expresados por poxvirus.	84
4.3.1	Clonaje y expresión de vTNFRs	84
4.3.2	Actividad anti-TNF α y anti-LT α de los vTNFRs	85
4.3.3	Actividad anti-tmTNF α de vTNFRs	88
4.4	Estudio <i>in vivo</i> del papel de la proteína CrmD en la patogénesis del virus Ectromelia	90
4.4.1	Generación de ECTV RevSECRET	90
4.4.2	Expresión y actividad de la proteína CrmD expresada por los distintos ECTV recombinantes	92
4.4.3	Ambos dominios de CrmD son esenciales en la patogénesis de Ectromelia	93
4.4.4	La actividad del dominio anti-TNFSFLs de CrmD reduce la activación de células <i>natural killer</i> (NK) en los ganglios poplíteos	95
4.5	Estudio de la interacción de CrmD con GAGs	98
4.5.1	CrmD se une a GAGs con alta afinidad	98
4.5.2	CrmD interacciona con GAGs a través del dominio SECRET	99
4.5.3	Mediante la unión a GAGs, CrmD puede interactuar con TNFSFLs en la superficie celular	101
4.5.4	La estructura tridimensional del dominio SECRET esconde un motivo de unión a GAGs	102
4.5.5	Las bases moleculares del complejo SECRET-hCX ₃ CL ₁ no explican la alta afinidad del dominio SECRET por otras CKs	104
5	DISCUSIÓN	105
5.1	Los dominios de CrmD, CRDs y SECRET, son estructural y funcionalmente independientes.	107
5.2	Los vTNFRs presentan distinta especificidad de ligando gracias a estrategias moleculares propias	110
5.3	Las dos actividades inmunomoduladoras de CrmD, anti-TNF y anti-CKs, son esenciales para la patogénesis de ECTV.	118
6	CONCLUSIONES	125
7	BIBLIOGRAFÍA	129

ABREVIATURAS

35K	proteína de 35 kilodaltons
APRIL	ligando inductor de proliferación
BAFF	factor de activación de células B
BCMA	proteína de maduración de células B
BSA	albúmina de suero bovino
CaPXV	Capripoxvirus
CEV	virión con envuelta asociado a la célula
CK	quimioquina
CKBP	proteína de unión a quimioquinas
CKR	receptor de quimioquinas
CMC	carboximetilcelulosa
CMPV	virus Camelpox
CPXV	virus Cowpox
CRD	dominio rico en cisteínas
CrmD (A, B, C, E)	modificador de la respuesta de citoquinas D (A, B, C, E)
CSA (B)	condroitín sulfato A (B)
CTL	linfocitos T citotóxicos
DD	dominio de muerte
DL ₅₀	dosis letal 50
DMEM	medio esencial mínimo de Dulbecco
dpi	días postinfección
DPXV	virus Deerpox
ECTV	virus Ectromelia
EE	error estándar
EEV	virión con envuelta extracelular
ELISA	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FCS	suero fetal de ternera
GAG	glicosaminoglicano
GFP	proteína fluorescente verde
GzB	granzima B
HCMV	citomegalovirus humano
HR	humedad relativa
HS	heparán sulfato
h/mTNF α	TNF α humano/murino
HVEM	mediador de entrada de herpesvirus
IEV	virión intracelular con envuelta
IFN	interferón
IL	interleuquina
IMV	virión intracelular madura sin envuelta
IRES	sitio interno de entrada del ribosoma
ITR	repeticiones terminales invertidas
IV	virión inmaduro sin envuelta
kb	kilobase
kDa	kilodalton
LIGHT	ligando inducible relacionado con la LT
LPS	lipopolisacárido
LT	linfotóxina

MCV	Mollusum Contagiosum Virus
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
moi	multiplicidad de infección
MPXV	virus Monkeypox
mRNA	RNA mensajero
MWCO	peso molecular límite
MYXV	virus mixoma
NFkB	factor nuclear kB
Ni-NTA	columnas de agarosa níquel
NK	célula asesina natural
OD	densidad óptica
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	marco de lectura abierto
Po, 1, 2	pase 0, 1, 2
PAC	puromicin acetiltransferasa
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PFA	paraformaldehído
PLAD	dominio de ensamblaje pre-ligando
RANKL	ligando de receptor activador para NFkB
RMP	resistencia a <i>mousepox</i>
RT	temperatura ambiente
RU	unidad de resonancia
SCP	<i>SECRET containing protein</i>
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato
SECRET	<i>smallpox virus encoded chemokine receptor</i>
SFV	virus del fibroma de Shope
SPR	resonancia de los plasmones de superficie
sTNF α	TNF α soluble
TACE	enzima conversora del TNF
tmTNF α	TNF α transmembrana
TNF α	factor de necrosis tumoral α
TNFR	receptor del factor de necrosis tumoral
TNFSFL/R	ligando/receptor de la superfamilia del TNF
TRAF	factor asociado a TNFR
TRAIL	ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF
TWEAK	inductor débil de apoptosis similar al TNF
UF	unidad de fluorescencia
UFP	unidad formadora de placa
VACV	virus Vaccinia
VARV	virus de la Viruela
vCCI	inhibidor viral de CKs del tipo CC-
vIFN-IBP	proteína viral de unión a IFN de tipo I
vIFN- γ R	receptor viral del IFN- γ
vIL-18BP	proteína viral de unión a IL-18
vTNFR	receptor viral del factor de necrosis tumoral
YLDV	<i>Yaba Like Disease Virus</i>

RESUMEN

Cytokines are important inducers and regulators of the anti-viral immune response. Tumour necrosis factor α (TNF α) and chemokines (CKs) are expressed shortly after a viral infection to regulate the effector functions and recruitment of the immune cells that can limit viral spread. Nevertheless, during millions of years of interaction with their hosts, poxviruses have designed effective mechanisms to block the activity of these cytokines.

One of these viral strategies is the expression of soluble versions of homologues of cellular TNF α receptors (vTNFRs). Four different vTNFRs have been described so far and named cytokine response modifier B (CrmB), CrmC, CrmD and CrmE. The genes of these vTNFRs are encoded differentially among the species of poxviruses. For instance, Cowpox virus (CPXV), a virus with a broad host range, can express all these vTNFRs, whereas other host-restricted poxviruses, such as Variola virus (VARV), the causative agent of smallpox in humans, or Ectromelia virus (ECTV), that causes a smallpox-like disease in mice (mousepox), uniquely encode for CrmB and CrmD, respectively. We have identified some differences in ligand affinity and specificity among several vTNFRs that might explain the differences of the expression profile of these anti-TNF α proteins in poxvirus species.

Unlike CrmC and CrmE, CrmB and CrmD possess an extended C-terminal domain that blocks CK activity *in vitro*. This domain was named SECRET for smallpox virus encoded chemokine receptor. Therefore, CrmB and CrmD display a dual immunomodulatory function, anti-TNF α and anti-CKs. We have determined the cytokines belonging to the families of TNF (TNFSFLs) and CKs that are ligands for the CrmD protein from ECTV. We have found that CrmD is not only able to interact with TNF α but also binds LT α , LT β , APRIL and LIGHT with high affinity. In addition, the minimum sizes of this protein required for the activity of the anti-TNFSFLs and SECRET domains have been determined. Surprisingly, the anti-TNF α domain of CrmD consists of only three cysteine rich domains (CRDs) and not four as it was previously described.

The structure of some TNFSFL-TNFR complexes has been described. However, little is known about the molecular basis of TNFSFL-vTNFR interaction. In order to better understand how these viral proteins can efficiently block TNFSFL functions, a wide collection of CrmD mutants was generated. Some mutations abolished CrmD interaction with TNFSFL, suggesting important implications for these mutated residues in TNF binding. Interestingly, one mutant significantly improved the ability of CrmD to block human LT α . This molecular study could provide some relevant data for the design of new and more efficient anti-TNF α drugs used for the treatment of inflammatory disorders.

Mousepox, caused by ECTV in susceptible mice, is a well-established model for the study of poxvirus pathogenesis that involves the footpad infection of the natural host of the virus. Using different recombinant ECTVs, with CrmD deleted or encoding only one of the two domains of the protein, we have determined that both, the anti-TNFSFL and SECRET domains are essential for virulence. Natural killer cell (NKs) and cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses are known to be important for the defense against ECTV in resistant mice. In order to understand the mechanism used by CrmD to impair the anti-viral response, we have determined the effect of our different CrmD recombinant ECTVs on NK and CTL responses of susceptible mice. Interestingly, ECTVs encoding an active anti-TNF domain of CrmD were able to control the NK cells activation in the popliteal lymph nodes two days after infection. However, only wild type ECTV, that expresses a full length CrmD, impaired the CTL response in the spleen a week post-infection, suggesting an important role of the SECRET domain in modulating the adaptive immune response of the host.

In addition to the SECRET domain of CrmD, ECTV encodes for other CK binding proteins (vCKBPs) such as vCCI or A41. However, the absence of the SECRET domain seems not to be replaced by those vCKBPs. We have found that the SECRET domain also allows CrmD to bind to glycosaminoglycans (GAGs) expressed on the cell surface. The interaction CrmD-GAGs could facilitate the retention of this protein in high concentration close to cellular TNFRs and therefore, making the anti-TNF activity of CrmD more efficient.

Las citoquinas son importantes en la inducción y regulación de la respuesta anti-viral. Tras una infección viral, con el fin de limitar la propagación del virus, el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y las quimioquinas (CKs) son expresados para regular el reclutamiento y las funciones efectoras de las células inmunológicas. Sin embargo, durante años de interacción con sus hospedadores los poxvirus han diseñado mecanismos para la inhibición de estas citoquinas.

La expresión de homólogos solubles de los receptores celulares del TNF α (vTNFRs), es una de estas estrategias virales. Hasta la fecha se han descrito cuatro vTNFRs diferentes, el modificador de la respuesta de citoquinas B (CrmB), CrmC, CrmD y CrmE. Las distintas especies de poxvirus expresan de manera diferencial estos vTNFRs. Así, mientras que el virus cowpox (CPXV), con un amplio rango de hospedador, expresa los cuatro vTNFRs, el virus de la viruela (VARV), agente causal de la viruela humana, o el virus ectromelia (ECTV), que sólo infecta ratones, únicamente expresan CrmB y CrmD, respectivamente. Se han encontrado diferencias entre los distintos vTNFRs en la especificidad y afinidad por el ligando que podrían explicar este patrón de expresión en las diferentes especies de poxvirus.

CrmB y CrmD, a diferencia de CrmC y CrmE, contienen un dominio C-terminal que inhibe la actividad *in vitro* de algunas CKs. Este dominio se denominó SECRET por *smallpox virus encoded chemokine receptor*. Así, CrmB y CrmD poseen una doble actividad, anti-TNF α y anti-CKs. Se han determinado los ligandos para la proteína CrmD de ECTV dentro de las familias del TNF (TNFSFLs) y las CKs. Se encontró, que a parte del TNF α , CrmD podía interactuar con alta afinidad con LT α , LT β , APRIL y LIGHT. Además, se delimitó la longitud mínima activa de ambos dominios de CrmD. Sorprendentemente, el dominio anti-TNFSFLs de CrmD fue activo con sólo tres dominios ricos en cisteínas (CRDs) en lugar de los cuatro previamente descritos.

Algunos complejos TNF-TNFRs han sido descritos estructuralmente. Sin embargo, se conoce muy poco de las bases moleculares de la interacción TNF-vTNFR. Por ello, se decidió realizar un análisis exhaustivo mediante mutagénesis dirigida de CrmD. Algunos mutantes fueron incapaces de interactuar con TNFSFLs, lo que sugiere que esos residuos podrían jugar un papel importante en la unión de CrmD al ligando. Se obtuvo un interesante mutante con una actividad frente al hLT α significativamente mayor que la proteína parental. Este análisis podría aportar información muy valiosa para el diseño de nuevos medicamentos anti-TNF α utilizados frente algunas enfermedades inflamatorias.

La enfermedad causada por ECTV en ratones susceptibles, *mousepox*, que implica la infección por vía subcutánea del hospedador natural del virus, es un modelo ampliamente extendido para el estudio de la patogénesis de poxvirus. Mediante este modelo y utilizando ECTV recombinantes para distintas formas de la proteína CrmD, se encontró, que ambos dominios de la proteína, anti-TNFSFLs y SECRET, son fundamentales para la virulencia. Está descrito que la respuesta de las células asesinas naturales (NKs) y de los linfocitos T citotóxicos (CTLs), es esencial en la defensa frente a ECTV de ratones resistentes. Con el fin de entender el mecanismo que subyace en el control de la respuesta anti-viral de CrmD, se estudió el efecto de los distintos ECTV recombinantes generados, sobre la respuesta NK y de CTLs en ratones susceptibles. Se encontró que los ECTV que expresaban un dominio anti-TNFSFLs activo, reducían la activación de las células NKs en los ganglios poplíteos a los dos días postinfección. Sin embargo, sólo el virus parental con una proteína CrmD completa, superó la respuesta de CTLs que se da una semana después de la infección en el bazo. Esto sugiere que el dominio SECRET podría tener un papel importante en la modulación de la respuesta adaptativa.

ECTV, además del dominio SECRET, expresa otras proteínas con capacidad anti-CK (vCKBPs) como 35K o A41. Sin embargo, estas vCKBPs adicionales no compensan la ausencia del dominio SECRET. Se descubrió que mediante el dominio SECRET, CrmD podía interactuar con glicosaminoglicanos (GAGs) de superficie con alta afinidad. Esta propiedad podría permitir a CrmD retenerse y concentrarse en la membranas celulares entorno a los TNFRs celulares y así, desarrollar su actividad anti-TNFSFLs de manera más eficiente.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Familia viral *Poxviridae*

El origen de los poxvirus, como el de los virus en general, es aún hoy objeto de grandes dudas y debates. Se contemplan tres posibles hipótesis: (a) Se advierte la posibilidad de que los virus constituyan un reducto de supervivientes procedente de un mundo viral anterior a la aparición de la primera célula; (b) También pudo ocurrir que un conjunto de genes celulares se independizaran de la célula y adquiriesen la propiedad de transmitirse de célula a célula de manera parasitaria, (c) o que incluso, una célula sufriera una reducción y simplificación de su genoma hasta el punto de necesitar invadir otra célula para utilizar su maquinaria enzimática con el fin de replicarse y subsistir (Koonin y cols., 2006).

Los últimos estudios genómicos han aclarado estas hipótesis y sugieren que, de todos los virus DNA grandes núcleo-citoplasmáticos, sólo las familias *Poxviridae*, *Iridoviridae*, *Asfarviridae* y *Phycodnaviridae* podrían tener un ancestro común (Iyer y cols., 2001; Iyer y cols., 2006). Sin embargo, los poxvirus poseen características que los hacen únicos. Estos virus son, junto a los mimivirus, los dos únicos grupos de virus que no necesitan entrar en el núcleo de la célula durante su ciclo replicativo, por lo que poseen enzimas propias no presentes en los virus que poseen una fase nuclear en su ciclo viral.

Entre los virus englobados en la familia *Poxviridae* existen pocos patógenos humanos. Sin embargo, entre sus especies se encuentra el virus de la viruela (VARV), agente causal de la viruela, la enfermedad infecciosa más letal que la humanidad haya conocido, o el virus vaccinia (VACV), que fue utilizado como vacuna durante la campaña que la Organización Mundial de la Salud (OMS) puso en marcha para la erradicación de la viruela.

1.1.1 Genoma

Los poxvirus se caracterizan por poseer un genoma lineal de doble hebra de DNA de hasta 360 kb que les permite codificar unas 200 proteínas distintas. Una propiedad común a todos los poxvirus es la existencia de unas 10 kb de repeticiones invertidas (ITR) en cada uno de los extremos del DNA (Baroudy y cols., 1982). Estas regiones presentan una estructura desapareada en la que las dos hebras de DNA quedan conectadas mediante un *loop* en horquilla. Estas estructuras juegan un papel importante para la resolución de los concatámeros que se producen durante el proceso de replicación (Merchlinsky, 1990).

Hasta la fecha se han secuenciado completamente los genomas de varias especies de poxvirus. Se ha observado que la organización del genoma entre los miembros de esta familia está bien conservada (Lefkowitz y cols., 2006). Los marcos de lectura abierta (ORF) se encuentran altamente empaquetados, pero con bajo grado de solapamiento, a lo largo de ambas hebras de DNA. Las regiones centrales están altamente conservadas y es allí donde se localizan muchos de los genes estructurales responsables de la morfogénesis viral. Sin embargo, los ORF localizados en los extremos varían de una especie a otra y codifican en su mayor parte por proteínas con funciones determinantes del rango de hospedador del virus, de su patogenicidad y de la interacción virus-hospedador. Aunque estos genes terminales no son esenciales para la replicación del virus, son fundamentales para garantizar la supervivencia del virus en su hospedador.

1.1.2 Ciclo viral

Los poxvirus llevan a cabo todas las fases de su ciclo viral, desde la replicación hasta el ensamblaje, en el citoplasma, de manera independiente de los factores nucleares. Esta característica era única de los poxvirus entre todas las familias virales hasta que en 2010 se describió un ciclo de replicación similar para el mimivirus (Mutsafi y cols., 2010), un virus gigante con un genoma dsDNA de más de una megabase.

A lo largo de todo el ciclo de los poxvirus, se generan distintas formas de viriones (Roberts y Smith, 2008): virus inmaduro sin envuelta (IV), virus intracelular maduro sin envuelta (IMV), virus intracelular con envuelta (IEV), virus con envuelta doble asociados a la célula (CEV) y virus extracelular con envuelta doble (EEV). De éstos, IMV, CEV y EEV constituyen las formas infecciosas del virus. CEV es un virión asociado a la membrana celular que estimula la formación de filamentos de actina, facilitando así la infección de una célula

próxima o la liberación del virus para dar lugar al EEV que infecta células más alejadas. Por su parte, el IMV espera en el interior de la célula a la lisis para poder liberarse e infectar nuevas células sanas.

Existen todavía muchas incertidumbres sobre el mecanismo de entrada del virus. El hecho de que existan varios tipos de partículas infecciosas complica aún más el estudio de esta etapa del ciclo viral. Se ha propuesto que tras la unión con la superficie celular, la membrana más externa se desorganiza para permitir que la membrana interna se fusione con la membrana celular y posterior introducción del *core* en el citoplasma (Law y cols., 2006) (Figura 1 (1)).

Una vez se ha liberado el *core* en el citoplasma celular, éste es transportado mediante microtúbulos a regiones perinucleares (Carter y cols., 2003) (Figura 1 (2)). Allí, se desencapsida el DNA para que los genes tempranos, aproximadamente la mitad del genoma viral, puedan transcribirse a RNA mensajero (mRNA). Estos genes tempranos codifican para las proteínas necesarias para la replicación, la modificación del estado celular en beneficio del virus y para el control de la respuesta inmunológica innata del hospedador. Después de la replicación del DNA, se transcriben unos pocos genes intermedios que en su mayor parte codifican factores de transcripción para los genes tardíos. Por último, los genes tardíos son los responsables de la expresión de muchas proteínas estructurales y de las enzimas que se encapsidan junto con el genoma en la nueva partícula (Broyles, 2003).

Todo el proceso de morfogénesis de los nuevos viriones tiene lugar en una región celular conocida como factorías virales (Figura 1 (4)). La primera forma viral observable en estas factorías es el IV, estructuras esféricas de naturaleza proteica y lipídica que encierran todos los componentes del *core*. Tras el procesamiento de las proteínas del *core* el IV adopta la típica forma de ladrillo y pasa a quedar envuelto por una membrana dando así lugar al IMV. Muchos de los IMVs son liberados tras la lisis celular, pero otros son transportados nuevamente, mediante microtúbulos, a endosomas (Tooze y cols., 1993) o al trans-Golgi (Schmelz y cols., 1994) donde son rodeados por otra membrana para formar el IEV (Figura 1 (6)). El IEV llega a la periferia celular donde se fusiona con la membrana plasmática para dejar expuesto y asociado a la membrana la forma CEV (Figura 1 (7)). El virión se disocia de los microtúbulos iniciándose una señalización que promueve la polimerización de la actina bajo el CEV (Frischknecht y cols., 1999). Así, se forman las colas de actina que facilitan la infección célula a célula o la liberación de la forma EEV del virus. Recientemente, se ha descrito un mecanismo por el que una célula infectada repele la entrada de nuevos viriones para evitar la superinfección (Doceul y cols., 2010). De esta manera, un EEV o CEV que llegue a una célula infectada, es cargado en colas de actinas para transportarse a la siguiente célula no infectada. Gracias a este proceso, VACV puede acelerar su expansión *in vitro* y presumiblemente *in vivo* por encima de lo que sus tiempos de replicación indicarían.

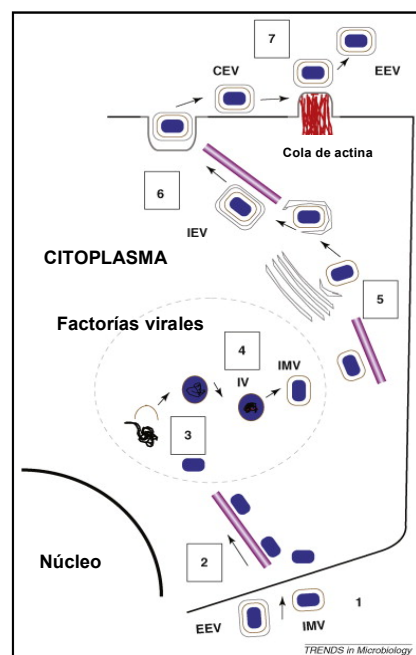


Figura 1: Ciclo de replicación de Poxvirus. Representación del ciclo viral de una partícula de VACV. 1) El virus se une a la célula y fusiona perdiendo la membrana para liberar el *core* en el citoplasma. 2) El *core* es transportado por microtúbulos hacia regiones perinucleares. 3) Liberación del DNA del *core* y replicación. 4) Dentro de las factorías virales, se generan los viriones inmaduros (IV) que acaban formando los viriones maduros intracelulares (IMV). La mayor parte de los IMV acaban saliendo de la célula cuando ésta es lisada. 5) Los IMVs que permanecen en la célula son transportados por los microtúbulos a regiones donde quedarán rodeados por una membrana, endosomas o cisternas del trans-Golgi. 6) Los IMVs se rodean de una doble envuelta para dar lugar a los IEV que son llevados a la superficie por microtúbulos. 7) La membrana externa se fusiona con la membrana citoplasmática para exponer el CEV en la superficie. Bajo el CEV, la polimerización de los filamentos de actina proyectan el CEV para la infección de células vecinas o lo liberan como EEV. Adaptado de Roberts y Smith, 2008.

1.1.3 Morfología y estructura

Un aspecto distintivo de los poxvirus respecto a los otros grupos de virus con los que se les relaciona es su morfología. Mientras que iridovirus y asfivirus presentan una cápside icosaédrica altamente ordenada, los poxvirus escapan de las formas geométricas regulares. Se ha descrito la apariencia de estos virus como en forma de ladrillo. Las imágenes de una célula infectada con poxvirus muestran factorías virales repletas de “ladrillos” de 400 nm (Risco y cols., 2002), es decir, un tamaño no muy lejano al de las bacterias más pequeñas.

La forma extracelular del VACV (Figura 2), modelo para todos los estudios estructurales de poxvirus, es un virus con envuelta. Una membrana externa que a su vez está formada por dos capas de 9 y 5 nm de espesor, respectivamente. Dentro de esta envuelta queda encerrado el *core* de la partícula, también con forma de ladrillo pero con dos concavidades en el centro de cada uno de los laterales más largos. En el *core* se protege el genoma viral y enzimas necesarias para la transcripción mediante una membrana interna que también presenta dos componentes, una capa externa de unos 17 nm de espesor conocida como capa empalizada y una pared interna de 8 nm (Cyrklaff y cols., 2005; Grunewald y Cyrklaff, 2006). Entre el *core* y la membrana externa residen dos cuerpos laterales de composición y función desconocida.

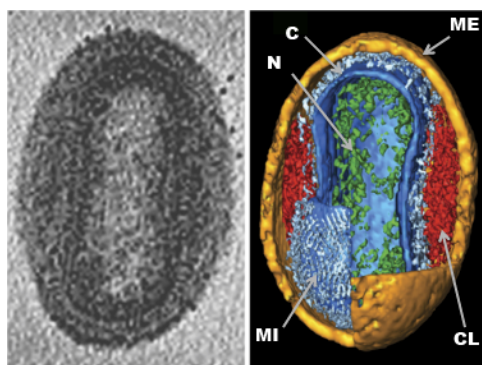


Figura 2: Tomografía electrónica de VACV. Reconstrucción tridimensional (derecha) de la estructura del virión de VACV a partir de la imagen real (izquierda). Mediante flechas se señalan en el esquema el *core* (C), la membrana externa (ME), la membrana interna o capa empalizada (MI), los cuerpos laterales (CL) y el núcleo (N). Adaptado de Grunewald y Cyrklaff, 2006.

1.1.4 Clasificación taxonómica

Los poxvirus se agrupan en dos subfamilias, *Entomopoxvirinae* y *Chordopoxvirinae*. Dentro de los primeros se reconocen patógenos de artrópodos, mientras que los segundos infectan vertebrados. Se diferencian 8 géneros entre estos últimos: Avipoxvirus, Capripoxvirus, Leporipoxvirus, Molluscipoxvirus, Orthopoxvirus, Parapoxvirus, Suipoxvirus y Yatapoxvirus (Poxvirus Bioinformatics Resource, www.poxvirus.org). De éstos, se han encontrado infecciones en humanos provocadas por Molluscipoxvirus, Orthopoxvirus, Parapoxvirus y Yatapoxvirus, pero sólo dos especies son verdaderos patógenos humanos obligados, VARV y el virus Mollusci Contagiosum (MCV).

El género de poxvirus más interesante, tanto por sus implicaciones clínicas y sanitarias como por su relevancia científica, es el de Orthopoxvirus. Por ello, a continuación se detallan algunos aspectos de las especies de Orthopoxvirus más trascendentes.

1.1.4.1 VARV

VARV fue el agente causal de la viruela (Fenner, 1993). Una enfermedad que ha resultado ser la afección infecciosa más letal de la historia de la humanidad con una tasa de mortalidad cercana al 30%. Es difícil calcular cuánta gente murió víctima de la viruela, pero se estima que sólo durante el siglo XX murieron entre 300 y 500 millones de personas. Además, el 70% de los infectados que consiguió sobrevivir quedó marcado

de por vida con las cicatrices de las clásicas pápulas (Figura 3) que el virus provocaba por todo el cuerpo y con ceguera permanente (Fenner, 1993).

El primer caso documentado de viruela es el del faraón Ramsés V (Figura 4), que murió en el año 1157 A.C., probablemente a causa de la enfermedad (Hornung, 1997). Los siguientes casos de los que se posee documentación fehaciente datan de los siglos IV, VII y X en China, India y el Suroeste Asiático, respectivamente. En Europa, la enfermedad no se estableció hasta el siglo XVI, tiempo por el cual el crecimiento demográfico y el movimiento activo de la población favoreció el aumento de la incidencia de la enfermedad (Fenner, 1993). De esta forma, parece que VARV tuvo una progresión desde el Pacífico Asiático hasta el Mediterráneo hasta instaurarse en el conjunto de la geografía mundial.

En el siglo XVIII el virus había establecido una pandemia y, aunque fueron muchos los esfuerzos por reducir su incidencia, no fue hasta mediados del siglo XX cuando una campaña a nivel mundial de la OMS, basada en la detección temprana, la cuarentena de los enfermos y la vacunación masiva, consiguió frenar el avance de la enfermedad. El último caso recogido de infección natural por VARV data de octubre del año 1977, en Somalia y tres años después, en mayo de 1980, la OMS declaró erradicada la enfermedad (Fenner, 1980; Fenner, 1993).

Desde entonces y ante el peligro de posibles escapes, se decidió eliminar todas las muestras de VARV presentes en los laboratorios de todo el mundo. Sólo por motivos científicos, como la investigación de la patogénesis del virus o el diseño de nuevas vacunas, se conservaron viales con el virus infeccioso en dos laboratorios de bioseguridad nivel P4 presentes en el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (*Center for Disease Control y Prevention*, CDC) de Atlanta, Georgia, USA y en el Centro de Investigación Estatal de Virología y Biotecnología (*State Research Center of Virology y Biotechnology*, VECTOR) en Koltsovo, Rusia. Sin embargo y tras intensos debates de la OMS, se ha decidido acabar con estos dos últimos reservorios del virus, una decisión que fue tomada en 1993 (Mahy y cols., 1993), pero que todavía hoy permanece a la espera del término de las investigaciones ya comenzadas y de los últimos acuerdos políticos para llevarlo a cabo. En la 67ª reunión de la Asamblea Internacional de la OMS que se celebrará en Ginebra, Suiza, en el año 2014, se volverá a debatir el devenir de estos últimos reservorios de VARV.

VARV es el único patógeno humano que la vacunación ha conseguido erradicar y representa uno de los mayores éxitos de la medicina. Un virus que desapareció cuando la comunidad científica desconocía gran parte de su naturaleza. De hecho, ni siquiera se entendía por qué la vacuna que se había administrado a los pacientes resultó tan efectiva. Por ello, la destrucción definitiva de los últimos reservorios del virus ha sido siempre objeto de discusión. Pero el riesgo es muy alto, la liberación del virus accidental o intencionadamente por parte de grupos terroristas en la sociedad actual, en la que la mayoría de la población no está vacunada, podría tener consecuencias funestas.

Otro aspecto por el que la investigación en esta familia viral sigue siendo altamente relevante es por el riesgo de las cada vez más frecuentes zoonosis en el hombre de otros poxvirus relacionados con VARV como Monkeypox (MPXV) o Cowpox (CPXV) (Essbauer y cols., 2010).



Figura 3. Rahima Banu de Bangladesh. Niño indio infectado con VARV en el que se observan las típicas pápulas que provocaba la viruela.

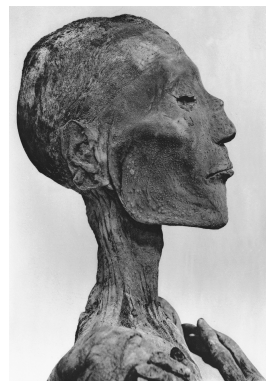


Figura 4. Momia de Ramsés V.

1.1.4.2 CPXV, VACV y MPXV

Los poxvirus CPXV y VACV tienen en común que han sido virus utilizados como vacunas en algún momento de la historia. CPXV fue el virus que utilizó Edward Jenner para la vacunación de la viruela en 1796 (Riedel, 2005). Era frecuente que las personas que trabajaban con vacas y caballos padeciesen una enfermedad similar a una viruela leve. Jenner observó que estos granjeros no se infectaban con viruela a pesar de los graves brotes de aquella época. Parecía que la enfermedad que contraían del ganado les protegía frente a la viruela. Jenner pensó que podría prevenir la viruela depositando líquido de las pústulas de CPXV sobre heridas en la piel de los pacientes. Aquellos experimentos funcionaron y constituyeron el primer escalón para el desarrollo de las vacunas frente a las infecciones virales. A pesar de su nombre, CPXV, no es un virus de ganado vacuno, sino que posee un amplio espectro de hospedadores, incluyendo el hombre y siendo los roedores su principal reservorio (Chantrey y cols., 1999).

Más tarde se descubrió que el virus que se utilizó durante la campaña de vacunación masiva frente a viruela a mediados del siglo XX era distinto al utilizado por Jenner. A este virus se le denominó VACV en referencia a “virus de la vacuna”. El origen y hospedador natural de VACV son desconocidos, aunque se ha sugerido que VACV está relacionado con el virus horsepox, un poxvirus que causaba lesiones en caballos y ha desaparecido (Alcami y Smith, 1996). VACV se ha convertido en el poxvirus más estudiado, tanto para la investigación básica sobre la biología y la patogénesis de esta familia viral, como por sus enormes aplicaciones clínicas y biotecnológicas. Con el tiempo, se observó que las primeras vacunas utilizadas para frenar la viruela podían acabar provocando serias complicaciones en los pacientes como encefalitis, miocarditis o infecciones generalizadas de VACV (www.bt.cdc.gov/agent/smallpox/vaccination). Por ello, hoy en día, el desarrollo de las nuevas vacunas se basan en vectores de la cepa de VACV *Modified Vaccinia Virus Ankara*, una cepa altamente atenuada que se generó a partir de más de 500 pases del VACV original (Mayr y cols., 1978) y que carece de sus efectos secundarios (Gomez y cols., 2008). Este vector, que puede soportar inserciones de hasta 25 Kb (Smith y Moss, 1983), permite la expresión de manera segura de proteínas recombinantes para la vacunación frente a enfermedades como la rabia (Cliquet y cols., 2008), el SIDA (Esteban, 2009) o la tuberculosis (Hawkrige y cols., 2008).

El riesgo de zoonosis de otros poxvirus similares a VARV en el hombre es uno de los factores que ha empujado la investigación en esta familia viral (Essbauer y cols., 2010). MPXV constituye el mayor peligro para la salud humana provocado por un poxvirus tras la desaparición de la viruela, ya que podría aprovechar la cada vez más reducida inmunidad contra poxvirus en la población, como resultado del cese de la vacunación contra la viruela, e invadir el nicho ecológico ocupado por VARV. Los primeros casos de *monkeypox* fueron detectados en 1970 en países del oeste y centro africano (Jezek y cols., 1986). Es una enfermedad con síntomas muy similares a la viruela, con tasas de mortalidad que, en países donde el SIDA es endémico, pueden ser tan altas como el 78% que se registró entre los años 2001 y 2004 en la República Democrática del Congo (Rimoin y cols., 2007). En los últimos 30 años, la incidencia de MPXV en este país ha subido del 2% al 20% entre los niños menores de 15 años (Rimoin y cols., 2010). Además, no se trata de una enfermedad confinada a África. En 2003, 72 personas de Estados Unidos fueron hospitalizadas por sospechas de esta infección tras la adopción de perros de la pradera que habían estado en contacto con ratas gigantes importadas desde Gambia. De estos pacientes, fueron confirmados 37 casos de *monkeypox* (Reed y cols., 2004).

Además, MPXV no es el único poxvirus que ha conseguido infectar al ser humano sino que también se han registrado casos de CPXV y de VACV. Recientemente, se ha aislado de un joven de 18 años de Noruega, un virus que resultó ser un CPXV que contenía una recombinación con el virus Ectromelia (ECTV) (Okeke y cols., 2012), agente causal de *mousepox*, una enfermedad de ratón similar a la viruela humana. Se teme que recombinaciones entre distintos poxvirus acaben por generar un virus adaptado al ser humano que se expandiría sin demasiados impedimentos entre una población que, actualmente, en gran parte, nunca ha sido vacunada contra VARV o algún otro poxvirus. Las consecuencias podrían ser catastróficas, teniendo la dificultad añadida de que, a diferencia de VARV que no posea un reservorio en la naturaleza, estos otros poxvirus están muy presentes sobre todo en las poblaciones de roedores y ardillas. Por ello, la comprensión de la patogénesis de esta familia viral es de vital importancia

1.1.4.3 ECTV

ECTV, agente causal de *mousepox*, fue descrito por primera vez en 1930 en Inglaterra donde causó una infección fatal de las colonias de ratones de un laboratorio (Marchal, 1930). El virus provocaba daños en el bazo y en el hígado y en los animales que conseguían sobrevivir aparecía la clásica erupción ulcerosa de la viruela humana. Desde la aparición de este primer aislado, la cepa ECTV Hampstead, fueron surgiendo nuevos brotes en los laboratorios de Europa y Estados Unidos aislándose cepas tan virulentas como ECTV Moscow (Andrewes y Elford, 1947) o ECTV Naval (Dick y cols., 1996) con una dosis letal 50 (DL₅₀) inferior a 1 unidad formadora de placa (ufp) en ratones susceptibles (Stanford y cols., 2007).

Esta tasa de mortalidad depende de factores del hospedador como la cepa de ratón, el sexo, la edad o su condición inmunológica, así como de la propia cepa viral, la dosis o la vía de inoculación utilizadas. Por ejemplo, la cepa ECTV Moscow provoca la muerte a bajas dosis de ratones susceptibles BALB/c, DBA/2 y C3H, mientras que las cepas C57BL6 y AKR son completamente resistentes y prácticamente asintomáticos a la infección (Esteban y Buller, 2005). Estas diferencias entre cepas de ratón han sido investigadas con el fin de conocer los factores determinantes de una buena respuesta anti-viral. Estudios genéticos han atribuido a cuatro genes un papel importante en el desarrollo de resistencia a *mousepox* (Delano y Brownstein, 1995). Estos genes se han denominado gen de resistencia a *mousepox* 1 (*Resistance to MousePox-1*, *Rmp1*), *Rmp2*, *Rmp3* y *Rmp4*. El gen *Rmp1* se vincula a la región del complejo de células *natural killer* (NK) responsable de la expresión de gran parte de los receptores de superficie que regulan la actividad de las células NK, miembros importantes de la respuesta innata en la defensa anti-viral (Fang y cols., 2011).

A pesar de presentar algunas diferencias con la viruela, *mousepox* ha sido el modelo más utilizado para intentar comprender la biología de VARV. Ambos poseen un único hospedador, el hombre para VARV y el ratón en el caso de ECTV. Sin embargo, aspectos como la vía de entrada en el hospedador o el tropismo viral difieren entre VARV y ECTV. A pesar de ello, estos dos virus presentan una patogénesis y manifestaciones muy similares.

1.2 Modulación inmunológica por Poxvirus

Cuando se produce una infección viral se pone en marcha una respuesta inmunológica en el hospedador con el objetivo de eliminar al patógeno. Por ello, si un virus quiere sobrevivir en ese ambiente hostil, tiene que ser capaz de escapar a esa reacción anti-viral. Típicamente, los virus pequeños de RNA, como el virus Influenza, desarrollan cambios antigénicos para no ser reconocidos por el sistema inmunológico (Hensley y cols., 2009). Sin embargo, los virus con un genoma grande poseen genes que codifican proteínas con funciones específicas en la evasión inmunológica (Alcami y Koszinowski, 2000). Durante años de co-evolución con sus hospedadores, los poxvirus han captado las claves de la reacción anti-viral y han diseñado estrategias diversas para modular o inhibir aquellos procesos que más limitan la expansión de su infección. Al mismo tiempo, el sistema inmunológico del hospedador se ha visto obligado a evolucionar para contrarrestar estas estrategias virales. Por lo tanto, el estudio de los mecanismos de evasión inmunológica de estos virus puede proporcionar información relevante para entender mejor los procesos del sistema inmunológico.

Los virus han desarrollado estrategias para mermar la efectividad de la respuesta anti-viral a distintos niveles. Los Poxvirus y otras familias virales, son capaces de interferir procesos intracelulares importantes, como la activación de ciertas cascadas de señalización o los procesos de presentación antigénica, para confundir así a la respuesta inmune y sobrevivir (Alzhanova y Fruh, 2010). Por otro lado, las citoquinas son importantes mediadores en la activación y regulación inmunológica. Ponen en marcha innumerables procesos y constituyen una forma de comunicación entre las células del sistema inmunológico. Por lo tanto, no es sorprendente observar que los virus hayan diseñado multitud de mecanismos para bloquear las funciones de estas citoquinas (Alcami, 2003).

1.2.1 Mecanismos intracelulares

Cuando una célula es infectada por un virus, se ponen en marcha una serie de procesos con el objeto de poner en alerta a las células circundantes y a todo el sistema inmunológico de la existencia de un patógeno. A este respecto, los conocidos como receptores de reconocimiento de patrones, como los *Toll-like receptors* o *RIG-I-like receptors*, desempeñan un importante papel induciendo citoquinas que modulan la respuesta anti-viral, tras el reconocimiento de estructuras conservadas en los patógenos (Bowie y Unterholzner, 2008). La liberación de citoquinas tales como el interferón (IFN) o el factor de necrosis tumoral α (TNF α) es clave en las primeras fases de la respuesta anti-viral induciendo la síntesis de factores proinflamatorios, la apoptosis de la célula infectada o activando un estado anti-viral celular (Lewis, 1982; Wong y Goeddel, 1986). Igualmente, la célula infectada, a través de la presentación de antígeno mediada por el complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I (MHC-I), activa la respuesta de linfocitos CD8+ y células NK que inducen la muerte de las células infectadas limitando así la expansión de la infección (Bennink, 1985; Trinchieri, 1989). Sin embargo, los virus se las han ingeniado para interferir con estos procesos de alerta desde el interior de la célula, silenciando a las células infectadas y facilitando así su replicación y propagación.

El IFN es la molécula anti-viral por excelencia. Esta citoquina fue descubierta por su capacidad de inhibir el crecimiento del virus Influenza en la membrana corioalantoidea de huevos de pollo (Isaacs y Lindenmann, 1957). Los IFN de tipo 1 como el IFN- α o el IFN- β , producidos tras la infección por la mayoría de los tipos celulares, pueden bloquear la difusión viral mediante la inducción de proteínas que interfieren con alguna de las fases del ciclo de replicación del virus (Lengyel, 1982). Sin embargo, los poxvirus han desarrollado multitud de estrategias para bloquear la respuesta inmunológica mediada por el IFN (Perdiguer y Esteban, 2009).

El TNF α es otra citoquina clave en la activación de una respuesta innata eficaz para solventar las infecciones virales. Una acción anti-viral directa del TNF α es la inducción de la muerte de la célula infectada al activar la ruta de las caspasas (Hengartner, 2000). De manera indirecta, el TNF α puede mediar la muerte celular al activar células T efectoras y células NK para la liberación de granzima B (GzB) que induce apoptosis en la

célula infectada (Vujanovic, 2011). Para contrarrestar estos efectos, poxvirus como ECTV, CPXV o VACV expresan un inhibidor de serín proteasas denominado, modificador de la respuesta de citoquinas A (CrmA). CrmA es capaz de bloquear la actividad proteasa de la caspasa-8 (Dobbelstein y Shenk, 1996) y de la granzima B (Quan y cols., 1995) evitando así la muerte celular. Además, muchos poxvirus expresan proteínas como K1 de VACV (Mohamed y McFadden, 2009) o CP77 de CPXV (Chang y cols., 2009) que inhiben la activación del factor nuclear inductor de la cadena ligera kappa de células B activadas (NFkB), principal interruptor de los procesos inflamatorios inducidos por el TNF α .

La respuesta celular o Th1, mediada por las células CD8+ y NK, es fundamental para la resolución de infecciones provocadas por patógenos intracelulares como son los virus. La activación de estas células es dependiente, en gran medida, de la presentación antigénica de péptidos virales cargados en MHC-I. Por ello, no sorprende, el interés de los poxvirus en inhibir esta presentación antigénica en alguna fase del procesamiento. Por ejemplo, CPXV codifica genes como *BR-012* (Alzhanova y cols., 2009) o *CPXV203* (Byun y cols., 2007) que evitan el transporte de MHC-I a la membrana citoplasmática. Secundariamente, esta inhibición de la exposición de MHC-I en la superficie, conlleva el riesgo para el virus de la activación de las células NK (Yokoyama, 2005). Sin embargo, los poxvirus han encontrado también una solución para este problema. La proteína OMCP (*Orthopoxvirus MHC-like Protein*) que actúa como un MHC-I viral, bloquea el receptor activador de las células NK, NKG2D, evitando así los efectos citotóxicos de las NKs sobre las células infectadas (Campbell y cols., 2007).

1.2.2 Mecanismos extracelulares

Las citoquinas, como parte importante en la regulación de una respuesta anti-viral efectiva, constituyen la forma de comunicación entre los componentes celulares encargados de acabar con la infección. La convivencia con el hospedador a lo largo de años de evolución ha permitido a los poxvirus captar genes de sus hospedadores para adaptarlos en su propio beneficio. Así, estos virus son capaces de expresar versiones virales solubles de receptores (viroceptores) o de citoquinas (viroquinas) con el fin de manipular la regulación de la respuesta anti-viral para garantizar su expansión en el organismo. Al mismo tiempo, los poxvirus expresan proteínas sin similitud de secuencia con algún componente celular conocido pero con funciones específicas de unión e inhibición de citoquinas (Alcami, 2003).

Mediante estas tres estrategias, viroceptores, viroquinas y proteínas virales de unión a citoquinas (Figura 5), los poxvirus consiguen inhibir factores muy importantes para la respuesta anti-viral como son el IFN, el TNF o las quimioquinas (CKs). Además de las moléculas que se detallarán a continuación, los virus secretan proteínas solubles para la unión e inhibición de otros componentes de la respuesta inmunológica, como son la vIL-1 β R (Alcami y Smith, 1992) o la proteína de unión a IL-18 (IL-18 *binding protein*, vIL-18BP) (Xiang y Moss, 1999), así como sus propias versiones virales de la IL-10 (Imlach y cols., 2002; Spencer y cols., 2002), factor de crecimiento epidérmico (Buller y cols., 1988) o la semaforina (Spriggs, 1999) (Figura 5).

1.2.2.1 Inhibición de la respuesta de IFN

Además de los mecanismos intracelulares que los poxvirus ponen en marcha para bloquear la señalización del IFN, estos virus expresan factores solubles con capacidad de unir y bloquear la interacción de distintos miembros de la familia del IFN con sus receptores celulares..

Así, por ejemplo, VACV, MPXV, VARV y ECTV codifican una proteína viral de unión a IFN de tipo I, vIFN-IBP, cuyos ortólogos respectivos son B18, B16, B17 y E194. La vIFN-IBP es una proteína secretada con tres dominios inmunoglobulina, similar al receptor de la IL-1 (Smith y Chan, 1991), que ha sido adaptada para la unión de los IFNs de tipo I (Symons y cols., 1995). Gracias a esta proteína, los poxvirus consiguen inhibir la interacción IFN-receptor celular y la señalización que conlleva al establecimiento del estado anti-viral celular (Colamonici y cols., 1995). Al contrario que los receptores celulares de los hospedadores, vIFN-IBP es capaz de interactuar con IFNs de especies distintas (Fernandez de Marco y cols., 2010), e incluso con el IFN de tipo III como el ortólogo en *Yaba Like Disease Virus* (YLDV) (Huang y cols., 2007)

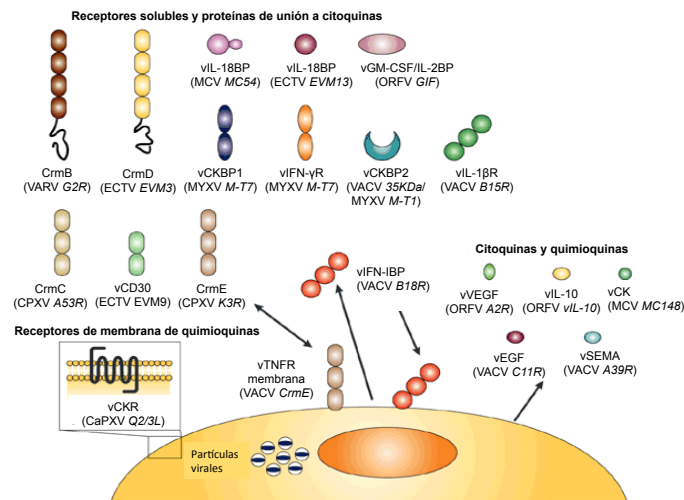


Figura 5. Esquema de los mecanismos extracelulares de evasión inmune de Poxvirus. Ejemplos representativos de proteínas virales con similitud de secuencia de ligandos (citoquinas/CKs) y receptores, del sistema de citoquinas del hospedador. Las proteínas de unión, son factores virales secretados que unen citoquinas o quimiocinas, pero carecen de similitud de secuencia con proteínas del hospedador. Se indica el nombre de cada proteína y, entre paréntesis, el nombre del gen codificado por los correspondientes virus: Molluscum Contagiosum Virus (MCV); Virus Mixoma (MYXV); Orf-virus (ORFV); Capripoxvirus (CaPXV); Virus Ectromelia (ECTV); Virus Vaccinia (VACV); Virus de la viruela (VARV); Virus Cowpox (CPXV). Adaptado de Alcami, 2003.

Esto es un signo de que los virus, no sólo han copiado los sistemas de sus hospedadores sino que han adaptado y mejorado las estrategias para poder tener un rango de hospedador más amplio o inhibir varias citoquinas distintas con una única proteína. A este mismo respecto, la vIFN α / β BP de poxvirus tiene la propiedad de poder unirse a los glicosaminoglicanos (GAGs) presentes en la superficie celular (Montanuy y cols., 2011). Gracias a esta propiedad, mediada por el dominio 1 N-terminal de la proteína, la vIFN α / β BP es secretada de la célula infectada y retenida en las células circundantes sanas, evitando que la señalización del IFN en estas células limite la expansión de la infección (Alcami y cols., 2000).

El receptor viral de IFN- γ (vIFN- γ R) es un buen ejemplo de mimetismo molecular para la inhibición del IFN. M-T7 en el virus Mixoma (MYXV) (Mossman y cols., 1995), o B8 en VACV (Alcami y Smith, 1995) son proteínas solubles con similitud estructural a la región extracelular del receptor del IFN- γ . Estas proteínas actúan como receptores solubles, se secretan, interaccionan con el IFN- γ y bloquean su interacción con el receptor celular. Pero mientras que M-T7 inhibe específicamente el IFN- γ de conejo, la proteína de VACV interacciona con IFN- γ de numerosas especies, lo que le ha podido conceder una ventaja para infectar distintos hospedadores durante su evolución (Alcami y Smith, 1996). Además, al infectar ratones susceptibles BALB/c con 500 ufp/ratón de un virus ECTV deficiente en el vIFN- γ R, se registró una supervivencia cercana al 100%, que contrasta con la DL₅₀ próxima a 1ufp/ratón del virus parental (Sakala y cols., 2007). Esto sugiere que vIFN- γ R es un factor de virulencia importante para la patogénesis de ECTV.

1.2.2.2 Modulación de la actividad de CKs

Las CKs son una familia de pequeñas citoquinas que además de regular las funciones de los leucocitos, atraen a estas células hacia el sitio de infección (Baggiolini, 1998). Los más de 40 miembros se agrupan en cuatro clases en función de la disposición de los primeros residuos de cisteínas en su secuencia: CC-, CXC-, C- y CX₃C- CKs. Cada CK es reconocida por su receptor específico en la célula lo cual determina qué células deben migrar durante un proceso inflamatorio. Además de con su receptor, las CKs son capaces de interaccionar con los GAGs de la superficie celular para la formación de gradientes quimiotácticos que, en último término, guían a las células a través de los tejidos (Handel y cols., 2005; Proudfoot y cols., 2003). La inhibición de la interacción tanto con el receptor como con los GAGs, resulta en el bloqueo de la función quimiotáctica *in vivo*.

Este sistema de CKs es un objetivo muy atractivo para los virus, que no sólo son capaces de inhibir las CKs mediante proteínas virales de unión a CKs (vCKBPs), sino que también, pueden regular estos mecanismos de migración celular en su beneficio, produciendo sus propias versiones virales de CKs (vCKs) o de receptores de CKs (vCKRs) (Alcami, 2003). Sin embargo, estas dos últimas estrategias son más frecuentes dentro de la familia *Herpesviridae*. Los Herpesvirus utilizan las vCKs para inducir o evitar el reclutamiento de un tipo celular específico y, de esta forma, facilitar la expansión de la infección (Penfold y cols., 1999) o evadir la respuesta anti-viral (Kledal y cols., 1997), respectivamente. Una de las pocas vCKs codificadas por Poxvirus, MC148 de

MCV, es una antagonista específico de CCR8 (Luttichau y cols., 2000). Por otro lado, existen muchas dudas acerca de la verdadera función de los vCKRs. Aunque en poxvirus se han identificado algunos genes con una posible función de vCKR, todavía existen pocas evidencias de que estas proteínas puedan modular las funciones de las CKs. Uno de estos pocos ejemplos lo constituye el receptor viral de CCL1 codificado por YLDV (Najarro y cols., 2003).

1.2.2.2.1 vCKBPs

Las vCKBPs son proteínas solubles expresadas por los virus, que se unen a las CKs en solución pudiendo inhibir su anclaje a las superficies o su señalización a través de los receptores celulares. No comparten similitud de secuencia con ningún componente celular conocido con lo que constituyen nuevas estrategias moleculares de interacción con CKs (Seet y McFadden, 2002). Esto ha despertado el interés de muchos biólogos estructurales haciendo que las vCKBP sean uno de los componentes de la maquinaria viral de evasión inmunológica mejor estudiada a nivel molecular (Arnold y Fremont, 2006; Bahar y cols., 2008). Estas vCKBPs se están incluso adaptando a la clínica para el tratamiento de aquellos desórdenes relacionados con la llegada masiva de células inflamatorias.

En función de sus características de secuencia y el virus que las codifica, las vCKBPs se pueden agrupar en distintas subfamilias. A continuación se detallan los distintos grupos de vCKBPs en relación a los miembros más representativos

T7

La proteína M-T7 de MYXV y S-T7 del virus del fibroma de Shope (SFV). Aunque estas proteínas se describieron como vIFN γ R, cuando se infectaron conejos susceptibles con un MYXV deficiente en M-T7 se observó una llegada masiva de células a las zonas de la dermis donde el virus de delección estaba replicando (Mossman y cols., 1996). Además de inhibir el IFN γ , resultaron ser proteínas capaces de interaccionar con CKs de las subfamilias C-, CC- y CXC-, impidiendo la unión de las CKs a los GAGs bloqueando la formación de los gradientes quimiotácticos (Lalani y cols., 1997). Sorprendentemente, el ortólogo de M-T7 y S-T7 en VACV, B8, no presenta esta capacidad de unir CKs (Alcami y cols., 1998), inhibiendo únicamente la actividad del IFN γ .

T1/35K

Muchos poxvirus expresan una vCKBP de 35 kilodaltons (kDa) (35K) con capacidad de unir con gran afinidad CK del tipo CC- (Alcami y cols., 1998; Graham y cols., 1997; Smith y cols., 1997), de ahí el otro nombre que se le otorga a esta subfamilia de vCKBPs, inhibidor viral de CKs CC- (vCCI). Este grupo está representado por T1 en Leporipoxvirus y 35K en Orthopoxvirus (Alcami y Saraiva, 2009). Es uno de los grupos de vCKBPs mejor conocidos. Son proteínas que interaccionan con las CKs a través del dominio de unión al receptor, con lo que bloquean la interacción CK-CKR (Alcami y cols., 1998). Hasta la fecha, el estudio del papel *in vivo* de estas proteínas no ha arrojado datos determinantes y aunque sí parece que regula la llegada de células inmunológicas al sitio de infección, la delección de esta vCKBP no parece alterar significativamente la virulencia. De hecho, la incorporación del gen de la 35K de VACV cepa Lister en VACV cepa Western Reserve, un virus que carece de esta proteína, supuso una atenuación del virus cuando se inyectó por vía intranasal (Reading y cols., 2003). La actividad anti-CK de la proteína 35K podría estar evitando la llegada masiva de leucocitos impidiendo así el daño inflamatorio en los pulmones. Este concepto llevó a pensar que la 35K podría tener importantes aplicaciones en el tratamiento de trastornos pulmonares como el asma. En un modelo murino de asma, la inyección intrapulmonar de la 35K redujo los síntomas y se observó una reducción en la cantidad de leucocitos presente en los lavados pulmonares (Dabbagh y cols., 2000).

Al determinarse la estructura de la proteína 35K de CPXV (Carfi y cols., 1999), se observó que poseía una topología en sándwich- β no descrita en ninguna otra proteína anteriormente. Presentaba dos hojas- β paralelas conectadas por largos *loops* y pequeñas hélices- α . Estudios de mutagénesis en el ortólogo de ECTV sugirieron que la hoja- β 2 contenía la mayoría de los residuos ácidos necesarios para la interacción con los residuos básicos de las CKs (Arnold y Fremont, 2006). La estructura por resonancia magnética nuclear del complejo

vCCI-CCL4 reveló la interfase de interacción en el complejo y demostró que esta proteína era capaz además de interferir con la dimerización de la CK y los residuos de unión a GAGs (Zhang y cols., 2006a).

Esta estructura única se ha observado en otras vCKBPs que por su similitud han quedado englobadas en este grupo. La proteína A41 de VACV, a pesar de poseer sólo un 19% de similitud de secuencia con vCCI, adopta un plegamiento en sándwich- β casi idéntico (Bahar y cols., 2008). Los pequeños cambios que afectan sobre todo a los *loops* que conectan las hojas- β , podrían ser los responsables de que A41 además de unir CC- CKs una también CXC- CKs, haciéndolo además a través de los residuos implicados en la unión a GAGs de la CK (Bahar y cols., 2008). De hecho, se ha demostrado que el ortólogo de la proteína A41 de ECTV, E163, no inhibe la migración inducida por CKs *in vitro* pero sí bloquea la unión de las CKs a las superficies de GAGs (Ruiz-Arguello y cols., 2008). Mediante esta actividad, E163 sería capaz de inhibir la formación de gradientes quimiotácticos necesarios para la función de las CKs. Este efecto se ha demostrado ser relevante para la patogénesis de VACV ya que la delección del gen *A41L* de VACV cepa Western Reserve facilitó ligeramente la eliminación del virus e incrementó la respuesta inflamatoria en la zona de infección (Ng y cols., 2001).

Otra propiedad de algunas de estas vCKBPs, es la capacidad de interaccionar con GAGs. A41 y T1, pero no 35K, pueden unirse directamente a los GAGs expresados en las superficies (Ruiz-Arguello y cols., 2008; Seet y cols., 2001). Gracias a esta interacción, estas vCKBPs pueden aumentar su concentración y estabilidad en las membranas celulares, cerca de los CKRs. Igualmente, T1 y A41, que evitan la formación de los gradientes quimiotácticos al bloquear los sitios de unión GAGs de las CKs, podrían también romper estos gradientes de CKs, mediante su interacción directa con GAGs.

M3

M3 es expresada por el gamma-herpesvirus murino 68 (MHV-68) (Parry y cols., 2000; van Berkel y cols., 2000). M3 es la única vCKBP conocida capaz de interaccionar con las cuatro clases de CKs (C-, CC-, CXC-, CX₃C-) con alta afinidad. La estructura de M3 reveló que en realidad se trata de un dímero antiparalelo en el que el dominio C-terminal de una subunidad queda emparejado con el N-terminal del otro monómero para formar el sitio de unión a CKs (Alexander y cols., 2002). De esta manera, M3 consta de dos sitios de unión enfrentados que le permiten interaccionar con dos CKs al mismo tiempo. La interacción M3-CK ocurre de tal forma que tanto la unión de la CK a GAGs (Webb y cols., 2004) como a su receptor celular quedan inhibidos (Alexander-Brett y Fremont, 2007). Por ello no es de extrañar que se haya propuesto la utilización de M3 para el tratamiento clínico de algunos procesos inflamatorios. A este respecto, M3 es una molécula muy prometedora que ha dado muy buenos resultados en modelos de diabetes murinos. Su expresión en el páncreas redujo el reclutamiento de células inflamatorias a los islotes de Langerhans (Martin y cols., 2007).

Glicoproteína G

La subfamilia de herpesvirus, *alphaherpesviridae*, contiene en su envuelta una glicoproteína G con capacidad de unir un amplio rango de CKs de las clases CC- y CXC- (Bryant y cols., 2003). Se ha demostrado que la glicoproteína G del virus de la pseudorrabia de cerdo y del herpesvirus equino tienen capacidad para bloquear la migración inducida por hCXCL12 α *in vitro* (Bryant y cols., 2003; Viejo-Borbolla y cols., 2010b).

Recientemente, se ha descrito una sorprendente regulación de la actividad de las CKs para la glicoproteína G del virus Herpes Simplex al interaccionar con CKs CC- y CXC- potenciando su efecto quimioatrayente (Viejo-Borbolla y cols., 2012), lo cual podría facilitar al virus la infección de nuevas células.

pUL21.5

El citomegalovirus humano (HCMV) expresa una pequeña glicoproteína, pUL21.5, cuyo mRNA es empaquetado en los viriones. Se ha descrito que pUL21.5 puede interaccionar selectivamente con hCCL5 con muy alta afinidad ($K_D = 0,32$ nM) (Wang y cols., 2004). De esta manera, pUL21.5 es capaz de competir eficientemente la unión de hCCL5 a su receptor celular. A diferencia de las vCKBPs explicadas hasta ahora, que poseen un amplio rango de ligandos, esta proteína de HCMV se ha adaptado para bloquear específicamente una única CK, aunque no se puede descartar que interaccione con otras CKs ya que Wang y cols. sólo comprobaron la unión de tres CKs distintas.

Dominio SECRET

Además de estos grupos de vCKBPs, existe un dominio de interacción con CKs presente en algunas proteínas de inhibición del TNF codificadas por poxvirus, como en la proteína CrmB de VARV. Este dominio que interacciona con unas pocas CKs, fue descrito en el laboratorio y denominado SECRET por *Smallpox Encoded Chemokine Receptor* (Alejo y cols., 2006). La estructura cristalográfica del dominio SECRET presente en la proteína modificadora de la respuesta de citoquinas D (CrmD) de ECTV, reveló un plegamiento muy similar al de las vCKBPs, 35K y A41 (Xue y cols., 2011). Dado que el estudio de este dominio SECRET de CrmD es parte esencial de esta Tesis, se explicará con más detalle al hablar de los inhibidores del TNF codificados por poxvirus en el Apartado 1.3.

CKBPs no virales

Estas moléculas anti-CKs han sido también descritas en garrapatas y otros parásitos humanos. Se ha descrito que las garrapatas al chupar la sangre de sus hospedadores secretan una familia de CKBPs conocidas como evasinas (Deruaz y cols., 2008). De esta manera, las garrapatas consiguen bloquear la respuesta innata mientras permanecen ancladas a sus hospedadores. Hasta la fecha, se han descrito cuatro miembros dentro de esta familia con una especificidad muy restringida a dos o tres CKs. Por ejemplo, la evasina-1 interacciona únicamente con CCL3, CCL4 y CCL18, inhibiendo la unión de estas CKs a sus receptores celulares (Frauensschuh y cols., 2007). Por su parte, la evasina-3 inhibe CXCL1 y CXCL8 y la evasina-4 bloquea CCL5 y CCL11 (Deruaz y cols., 2008). Por tanto, así como los virus codifican pocas vCKBPs con un amplio rango de ligandos, las garrapatas han adoptado una estrategia diferente al expresar varias CKBPs con funciones inhibitorias específicas sobre unas pocas CKs. Los estudios estructurales realizados sobre la familia de las evasinas reveló que estas pequeñas CKBPs adoptan un plegamiento distinto a cualquier otra proteína conocida (Deruaz y cols., 2008). Las bases moleculares del complejo CCL3-evasina-1 demostró que existían ciertas similitudes con el complejo CCL4-vCCI pero con diferencias muy relevantes (Dias y cols., 2009). Por lo tanto, las evasinas constituyen una nueva estrategia molecular para la interacción con CKs.

Schistosoma mansoni es el parásito trematodo responsable de la esquistosomiasis humana (Pearce y MacDonald, 2002). Estudios de *cross-linking* con CKs radiactivas revelaron la presencia de una CKBP secretada por este parásito, a la que se denominó smCKBP (Smith y cols., 2005). Esta proteína, sin similitud de secuencia con ninguna otra CKBP o proteína celular conocida, interacciona con varias CKs entre las que se incluyen CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8 y CX3CL1. Aunque no se ha conseguido una forma recombinante del parásito deficiente en esta smCKBP para establecer su papel *in vivo*, se ha sugerido que la secreción de smCKBP por parte de los huevos que este trematodo deposita en sus hospedadores, podría facilitar la propagación del parásito por el organismo (Smith y cols., 2005).

1.2.2.3 Inhibición de la respuesta del TNF α

El TNF α , como el IFN, son citoquinas vitales durante las primeras fases de la respuesta anti-viral. La inducción de muchas otras citoquinas, como la mayoría de las CKs, depende de la señalización celular mediada por el TNF α . Además, esta citoquina es importante para la eliminación de las células infectadas mediante apoptosis. Se trata por tanto, de una molécula proinflamatoria esencial en las funciones de la respuesta innata y celular, con lo que es un claro enemigo de los virus.

Las estrategias virales para contrarrestar el efecto del TNF α son uno de los mejores ejemplos de mimetismo molecular. Especialmente, los poxvirus han incorporado en su genoma genes para la expresión de proteínas que imitan los dominios de unión a TNF α de los receptores celulares, son los conocidos vTNFRs, que pueden capturar el ligando en solución inhibiendo su interacción con el receptor. Además, algunos poxvirus expresan proteínas de unión al TNF α (vTNFBPs) sin similitud de secuencia con proteínas celulares conocidas, pero que han conseguido adaptar para la unión e inhibición del TNF α . Estos mecanismos anti-TNF α son el eje central de esta tesis, por lo que se explicarán en más detalle en el Apartado 1.3: “Sistema del TNF α y su modulación por poxvirus”.

1.3 Sistema del TNF α y su modulación por poxvirus

Hace más de un siglo que el doctor Bruns observó cómo el tamaño de los tumores de algunos de sus pacientes se reducía considerablemente tras una infección bacteriana (Bruns, 1888). A mediados del siglo XX se identificó que el lipopolisacárido (LPS) bacteriano era el responsable de dicha reducción al inducir un factor en el suero que por su efecto, se denominó TNF α (Carswell y cols., 1975). Desde entonces se han descrito muchos otros factores con similitudes estructurales al TNF α que conforman una de las familias de citoquinas más grandes, la superfamilia de los ligandos del TNF (TNFSFLs) con sus respectivos receptores celulares (TNFSFRs) (Locksley y cols., 2001).

Aunque se identificó y nombró, gracias a su potencial antitumorigénico, en algunas situaciones, el TNF α puede contribuir al desarrollo de cáncer induciendo la proliferación celular, la invasión o la metástasis de las células cancerígenas. La señalización del TNF α puede dar lugar a repuestas opuestas ya que es capaz de inducir apoptosis al tiempo que puede activar la transcripción de factores proinflamatorios regulados por NF κ B, puede mediar la necrosis tisular y ser parte importante en el desarrollo de órganos linfoides, se trata de una citoquina con dos efectos opuestos (Aggarwal, 2003). A día de hoy, la cascada de señales que activa el TNF sigue bajo un intenso análisis con el fin de comprender cómo y cuándo la interacción del TNF α con su receptor celular determina una señal de muerte o de supervivencia.

Lo que es evidente es que el TNF α juega un papel fundamental en la defensa ante las infecciones de todo tipo, incluidas las virales. El TNF se activa poco después de que un virus infecte a su hospedador para poner en marcha la respuesta mediante la inducción de CKs, moléculas de adhesión y otras citoquinas y regulando o tomando parte en los mecanismos efectores de las células del sistema inmunológico para eliminar las células infectadas lo antes posible. Es una molécula esencial para el establecimiento de una respuesta celular, o Th1, efectiva frente a una infección viral y, por ello, los poxvirus han adoptado elegantes estrategias para bloquear esta citoquina (Cunnion, 1999).

Por otro lado, la inducción desregulada de TNF α se encuentra detrás de muchos trastornos inflamatorios. Existen varias opciones en la clínica para el tratamiento de estas enfermedades (Wong y cols., 2008). Conocer cómo los poxvirus han conseguido inhibir el TNF α podría ayudar a diseñar mejores fármacos, más efectivos y con menores efectos secundarios.

1.3.1 TNFSFLs y TNFSFRs

Se han descrito 19 TNFSFLs que activan sus respuestas celulares a través de 29 TNFSFRs distintos (Figura 6). A excepción de la linfotoxina- α (LT α) y el inhibidor del crecimiento del endotelio vascular (VEGI) que sólo existen en forma soluble, los TNFSFLs se expresan como proteínas transmembrana de tipo II que en muchos casos son posteriormente procesados por proteasas para dar lugar a citoquinas solubles. Por su parte los TNFSFRs son proteínas transmembrana de tipo I y como los ligandos pueden ser procesados para generar versiones solubles. Estos receptores en solución son importantes para la regulación de las respuesta de estas citoquinas. Se pueden diferenciar dos tipos de TNFSFRs, los que presentan el llamado dominio de muerte (DD) en su extremo citoplasmático y los que no. Por lo general, los primeros están involucrados en la activación de vías proapoptóticas mientras que los segundos inducen señales de proliferación o supervivencia. Existe cierto grado de promiscuidad entre las interacciones TNFSFLs-TNFSFRs, con varios receptores para un mismo ligando. Así por ejemplo, LIGHT puede unirse a LT β R, HVEM o DR3 (Figura 6).

Tras la unión a su receptor, los TNFSFLs pueden mediar apoptosis (TNF α , LT α , TRAIL, VEGI, TWEAK, LIGHT y FasL), desarrollo de órganos linfoides secundarios (TNF α , LT α , LT β , RANKL) y activación y proliferación de células inmunológicas (APRIL, BAFF, CD40L, 4-1BBL, OX40L, CD27L, RANKL). Todo ello a través de cascadas de señalización que incluyen las de NF κ B, JUN N-terminal quinasa (JNK), quinasa activada por el mitógeno p42/44 (MAPK) o p35 MAPK (Aggarwal, 2003).

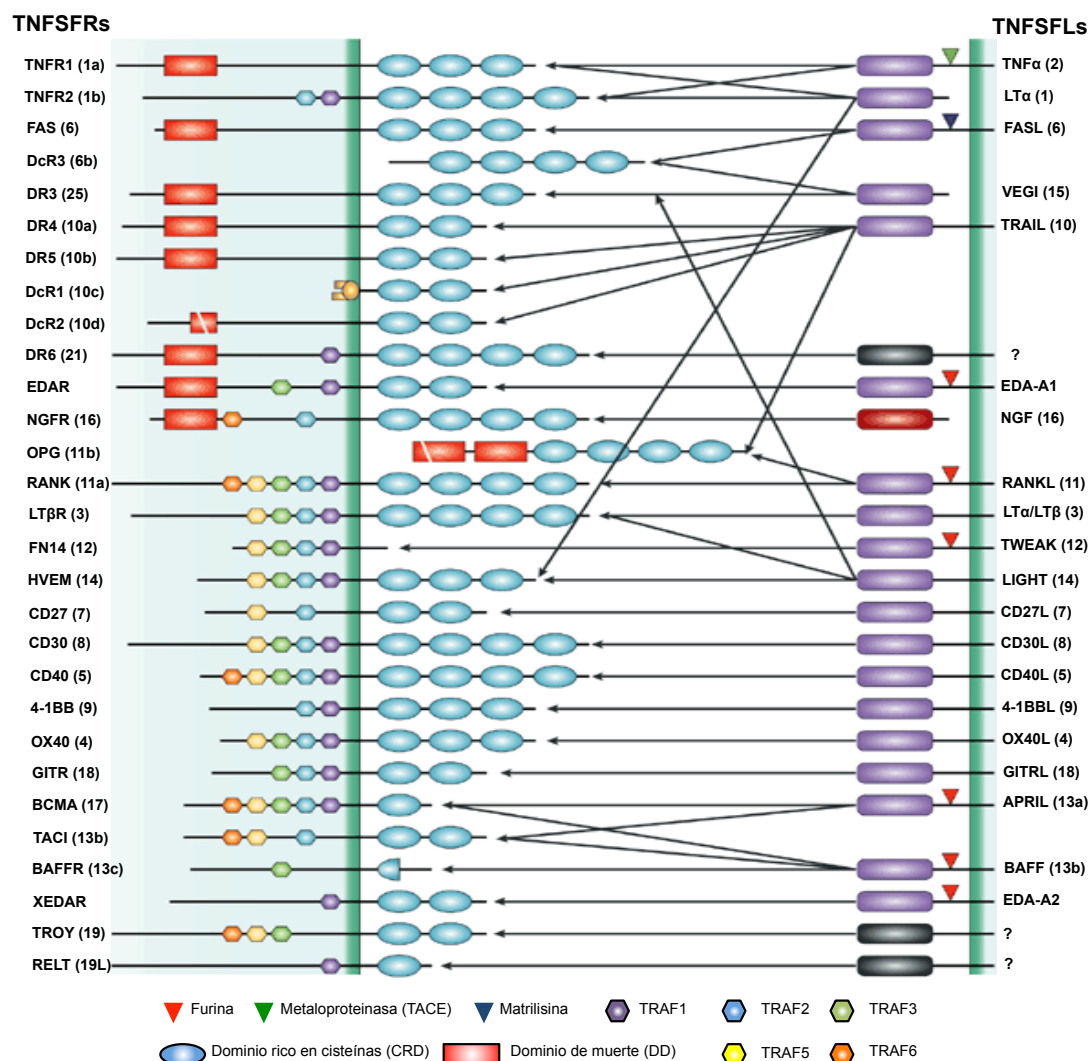


Figura 6. Ligandos y receptores de la superfamilia del TNFα. Los TNFSFRs para cada TNFSFL se indican mediante flechas. A excepción de LTα y VEGI que son citoquinas solubles, los TNFSFLs se expresan como proteínas de membrana de tipo II que después pueden ser procesadas por distintas enzimas: furina (triángulo rojo), TACE (triángulo verde) o matrilisina (triángulo azul). Los TNFSFRs son proteínas transmembrana de tipo I que cuentan con distintas repeticiones de dominios CRDs (círculo azul) en su dominio extracelular y de dominios de muerte (rectángulo rojo) o de dominios adaptadores TRAF (hexágonos), en la región citoplasmática. Se indica el nombre de los TNFSFLs y TNFSFRs y, entre paréntesis, el número correspondiente al nombre sistemático. El símbolo de interrogación (?) representa ligandos desconocidos. Adaptado de Aggarwal (2003).

1.3.1.1 Biología y estructura del TNFα y LTα

El TNFα se expresa como una proteína transmembrana de tipo II de 26 kDa principalmente en macrófagos, linfocitos activados y células NK. Después es procesada mediante la enzima convertidora del TNFα (TACE) para dar lugar a una citoquina soluble de 17 kDa (Black y cols., 1997). Tanto la forma transmembrana (tmTNFα) como la soluble existen como homotrímeros que interaccionan con dos receptores celulares TNFR1 y TNFR2 (Loetscher y cols., 1991). Lejos de ser un mero precursor, el tmTNFα está implicado en numerosos procesos inmunológicos e inflamatorios. De hecho, su señalización mediada principalmente por el TNFR2 (Grell, 1995) es suficiente para el desarrollo de la artritis reumatoide y resulta esencial en la defensa contra *Mycobacterium tuberculosis* (Saunders y cols., 2005). Por otro lado, además de su actividad como ligando, el tmTNFα puede actuar como receptor induciendo señalización reversa al interaccionar con sus receptores (Domonkos y cols., 2001). La importancia de esta señalización reversa se ha demostrado en la actividad de células T, macrófagos y células NK y puede jugar un papel relevante en las sinapsis inmunológicas para la activación de estas células efectoras (Eissner y cols., 2004).

El análisis cristalográfico del TNF α reveló que el trímero tiene una apariencia que recuerda a una campana, con una estructura compuesta totalmente por hojas- β antiparalelas en una topología típica de *jellyroll* (Van Ostade y cols., 1994).

La LT α , que guarda un 51% de similitud de secuencia con el TNF α , es una citoquina expresada por linfocitos T y B. Con una afinidad similar a la del TNF α , la LT α interacciona con TNFR1 y el TNFR2. A diferencia de muchos TNFSFLs, la LT α sólo existe como una proteína soluble de 25 kDa. La única forma de que la LT α se asocie a membranas es mediante su interacción con las subunidades β de la LT β para dar lugar a heterotrímeros transmembrana LT α 2 β 1 o LT α 1 β 2 (Browning y cols., 1993). Estas formas de LT β señalizan predominantemente a través del LT β R o HVEM (Figura 6).

Por lo general, la LT α se comporta de manera similar al TNF α *in vitro*, aunque en algunos casos con menor actividad específica. *In vivo* se sabe que tiene un papel muy importante en el desarrollo. Los ratones deficientes en LT α no tienen ganglios linfáticos, el bazo se encuentra desorganizado sin centros germinales y carecen de células NKs, células dendríticas e inmunoglobulinas A (De Togni y cols., 1994; Koni y cols., 1997; Matsumoto y cols., 1996), por lo que son ratones que sucumben fácilmente ante una infección.

Así como el papel del TNF α frente a las infecciones está ampliamente documentado (Gravestén y Borst, 1998), existen interrogantes acerca de las funciones de la LT α a este respecto. Se sabe que ratones deficientes en la respuesta del TNF α son altamente susceptibles a infecciones bacterianas intracelulares como *Listeria monocytogenes* (Nakane y cols., 1988) o *Mycobacterium tuberculosis* (Flynn y cols., 1995). Se ha encontrado que la delección añadida de la LT α agrava aún más la infección con una supervivencia media que pasa de los 56 días de los animales TNF α -/- a los 35 días de los TNF α -/-LT α -/- (Allie y cols., 2010). Respecto a las infecciones virales, la falta de la LT α conduce a una menor respuesta celular con una eliminación del virus más lenta que en algunos casos lleva a la muerte del animal como en los modelos del virus de Theiler (Lin y cols., 2003) y el citomegalovirus murino (Banks y cols., 2005). Sin embargo, el fenotipo en estos modelos podría deberse más a un defecto en el buen funcionamiento de los órganos linfoides secundarios que a la falta de LT α en sí misma.

1.3.1.2 Biología y estructura de los TNFSFRs

Los TNFSFRs se caracterizan por la presencia en su dominio extracelular N-terminal, de una serie de repeticiones ricas en cisteínas (CRDs), que según el tipo de receptor puede tener desde uno, como BCMA, hasta cuatro CRDs, como TNFR1 (Figura 6). Un CRD completo queda estructurado típicamente por unos 40 aminoácidos estabilizados por tres puentes disulfuro intramoleculares formados entre 6 cisteínas.

Los distintos estudios cristalográficos de complejos ligando-receptor dentro de esta familia han otorgado diferentes papeles a cada uno de los CRDs del receptor en la interacción con el ligando. Sin embargo, ningún trabajo ha conseguido darle una función clara al CRD4. La primera estructura que se resolvió fue la del complejo LT α -TNFR1 (Banner y cols., 1993). En este trabajo, al igual que en el complejo TNF α -TNFR2 (Mukai y cols., 2010), se observó que tres moléculas del receptor se unen al trímero del ligando (Figura 7). Ambas citoquinas quedan unidas al receptor tomando un aspecto de campana invertida. El CRD2 del receptor contiene la mayor parte de los residuos implicados en la interacción. De esta manera, se definió una zona, conocida como “*loop* de los 50”, que alberga los aminoácidos determinantes de la afinidad de la unión. Este “*loop* de los 50” se encuentra conservado y se solapa perfectamente en otros TNFSFRs. Sin embargo, existe mayor grado de divergencia en una zona del CRD3 que también presenta aminoácidos que se unen al ligando. A esta zona se le denominó como “*loop* de los 90” y se le responsabiliza de la especificidad y de la modulación fina de la interacción (Hymowitz y cols., 1999).

Al principio se pensaba que la trimerización del receptor que provocaba el ligando era la responsable de iniciar la señalización celular. Sin embargo, se descubrió que el receptor existe en forma trimérica antes de reconocer al ligando gracias a un dominio presente en el CRD1. A esta secuencia se le denominó dominio de ensamblaje pre-ligando (PLAD) y se manifestó esencial para la unión al ligando (Chan y cols., 2000). Además, en la interacción TNF α -TNFR2 se observó que esta agregación de moléculas de receptor en la superficie celular se magnificaba, no sólo por el PLAD, sino también gracias a la unión del ligando y a la señalización (Mukai y cols., 2010).

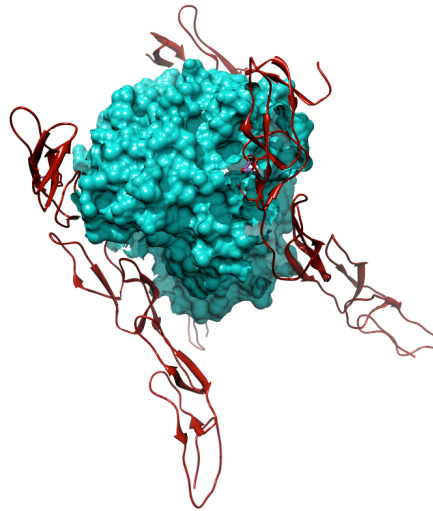


Figura 7. Estructura del complejo TNF α -TNFR2 (PDB: 3ALQ). Figura realizada con Chimera en la que se muestra el trimero de TNF α (superficie azul) unido por tres moléculas de TNFR2 ("lazos" rojos). La unión se da en la intersección entre subunidades de TNF α (Mukai y cols., 2010).

Las diferencias en el dominio citoplasmático de los TNFSFRs permite diferenciar dos grupos (Aggarwal, 2003). Aquellos receptores que presentan un DD están involucrados en la activación de la cascada de caspasas, y los receptores carentes del DD, que ponen en marcha su señalización gracias al reclutamiento de factores asociados a receptores de TNF (TRAFs) que conduce a señales de supervivencia y proinflamatorias.

Los receptores de TNF α y LT α , TNFR1 y TNFR2, son proteínas transmembrana de tipo II de 55 y 75 kDa respectivamente. TNFR1 está expresado por prácticamente todos los tipos celulares mientras que la expresión de TNFR2 está confinada a células inmunológicas (macrófagos, células NK, linfocitos, neutrófilos). Ambos presentan en su región extracelular cuatro repeticiones CRD, pero mientras que el TNFR1 contiene un DD citoplasmático, el TNFR2 presenta motivos de unión a TRAF. Esto hace que desarrollen cascadas de señalización diferentes (Wallach y cols., 1999). Aunque ambos receptores son capaces de interactuar con TNF α y LT α , se ha observado que la LT α no señala a través del TNFR2, que en este caso actuaría regulando las funciones de esta citoquina (Medvedev y cols., 1996). Por su parte, el TNF α actúa de manera preferencial a través de TNFR1. Se le han otorgado dos funciones al TNFR2. Se ha sugerido como el receptor principal del tmTNF α . De hecho, la interacción tmTNF α -TNFR2 es parte importante de las sinapsis inmunológicas que se dan para la activación de células de la defensa inmune, como sucede entre células NK y células dendríticas (Xu y cols., 2007a). Y por otro lado, se piensa que el TNFR2 podría actuar capturando el sTNF α para aumentar la concentración local de esta citoquina y así facilitar su interacción con el TNFR1 (Leeuwenberg y cols., 1995).

Tanto el TNFR1 como el TNFR2 pueden ser procesados enzimáticamente para dar lugar a receptores solubles para el control de la respuesta del TNF α . Por ejemplo, el TNFR2 soluble, que se encuentra en mayores niveles que el TNFR1 soluble, es el resultado de la acción de TACE, la misma metaloproteasa que procesa el TNF α (Peschon y cols., 1998). Se han encontrado elevadas concentraciones de estos receptores solubles en trastornos como el lupus eritematoso sistémico (Aderka y cols., 1993), artritis reumatoide (Roux-Lombard y cols., 1993) o cáncer (Aderka y cols., 1991).

1.3.2 Modulación viral de la respuesta de los TNFSFLs

1.3.2.1 Expresión de vTNFRs

Los vTNFRs son un mecanismo de evasión de las funciones de los TNFSFLs muy extendido entre los poxvirus, especialmente en orthopoxvirus. Son proteínas solubles que los virus secretan tras la infección y que se caracterizan por mimetizar el dominio extracelular de los TNFSFLs. Así, actúan uniéndose a los TNFSFLs en solución inhibiendo su interacción con el receptor celular.

Se han identificado cinco vTNFRs distintos: Las proteínas CrmB, CrmC, CrmD, CrmE y una versión viral del CD30 celular (vCD30).

vCD30 se ha descrito en CPXV, el virus Deerpox (DPXV) y ECTV, (Afonso y cols., 2005; Panus y cols., 2002; Saraiva y cols., 2002) (Tabla 1). Se trata de una versión soluble del receptor celular del ligando CD30 (CD30L) con dos repeticiones CRD. vCD30 es una proteína de 12 kDa que interacciona con muy alta afinidad ($K_D=0,6nM$) con CD30L, el único ligando conocido para CD30. De esta forma, los virus consiguen inhibir la interacción CD30-CD30L involucrada en la estimulación de células T, células B así como en la regulación de la respuesta celular de memoria (Umeda y cols., 2011). Se ha propuesto además que vCD30 es capaz de mediar señalización reversa a través del CD30L de membrana expresado en neutrófilos induciendo la expresión de IL-8 (Saraiva y cols., 2002). Esta propiedad añade un carácter nuevo hasta la fecha a un vTNFR. vCD30 es una molécula que no sólo es capaz de inhibir su ligando sino que también puede inducir una señalización en favor del desarrollo de la infección. Además, se ha demostrado que vCD30 inhibe la producción de IFN γ en esplenocitos, en un modelo murino de inducción de granuloma, bloqueando la respuesta inflamatoria de tipo Th1 (Saraiva y cols., 2002). Sin embargo, un ECTV recombinante deficiente en vCD30 no vio afectada su virulencia (Alejo y cols., 2009), lo que sugiere que aunque vCD30L pueda estar regulando la respuesta del hospedador, sus efectos no determinan la alta virulencia de este virus en este modelo experimental.

Las proteínas virales CrmB, CrmC, CrmE y CrmD, son homólogas a los TNFRs celulares, con una mayor similitud de secuencia con el dominio extracelular del TNFR2 (32%) que con el TNFR1 (22%).

T2, ortólogo de CrmB, es el único vTNFR descrito en Leporipoxvirus, representado por M-T2 en MYXV y S-T2 en SFV. S-T2 fue el primer vTNFR descrito y se identificó en el genoma de SFV, un virus de conejo (Smith y cols., 1991). Su homólogo en MYXV, M-T2, interacciona específicamente con el TNF α de conejo inhibiendo sus efectos citotóxicos *in vitro* (Schreiber y McFadden, 1994). M-T2 es un factor de virulencia importante para el desarrollo de la mixomatosis en conejos europeos infectados con MYXV. MYXV es letal al 100%, sin embargo, el virus recombinante MYXV Δ M-T2, que no expresa M-T2, mató a 3 de 8 conejos, observándose además, menores lesiones secundarias en los animales infectados (Upton y cols., 1991).

Tabla 1. Ejemplos de genes de vTNFRs y vTNFBPs presentes en los genes de Poxvirus. Se indica el nombre del gen para cada virus.

POXVIRUS	vTNFR					vTNFBP
	CrmB	CrmC	CrmD	CrmE	vCD30	
CPXV Brighton Red	V005	V191	V221	---	V015	---
CPXV GRI-90	I4R	A56R	K2R	K3R	D13L	---
ECTV Moscow	---	---	E3	---	E9	---
ECTV Naval	---	---	E6	---	E13	---
VARV Bangladesh 1978	G2R	---	---	---	---	---
VACV WR	---	---	---	---	---	---
VACV Lister	---	A53R	---	---	---	---
TPXV	---	---	---	---	---	2L
YLDV	---	---	---	---	---	2L
SPXV	---	---	---	---	---	003/148
DPXV	---	---	---	---	005	008
MYXV	T2	---	---	---	---	---
SFV	T2	---	---	---	---	---

La expresión de los vTNFRs CrmB, CrmC, CrmD y CrmE difiere entre las distintas especies de Orthopoxvirus (Tabla 1). Así, virus con rangos de hospedador muy amplios como CPXV, codifican los cuatro vTNFRs distintos (CrmB, C, D y E), mientras que ECTV y VARV, virus con un único hospedador, sólo expresan CrmD y CrmB, respectivamente. Aunque los ortólogos del gen de *CrmB* codificados por CPXV, MPXV y VARV, son muy similares en secuencia, se ha observado que presentan propiedades de especificidad de ligando distintas. Por ejemplo, CrmB de VARV, un virus estrictamente humano, fue la más eficaz en la unión e inhibición del TNF α humano (hTNF α) (Gileva y cols., 2006). Esto sugiere que los poxvirus han adaptado sus estrategias anti-TNF α en función de sus hospedadores.

Cuando se identificaron los vTNFRs, se describió que mientras que CrmC (Smith y cols., 1996) y CrmE (Saraiva y Alcamí, 2001) sólo unían TNF α , CrmB (Hu y cols., 1994) y CrmD (Loparev y cols., 1998) eran también capaces de inhibir *in vitro* los efectos de LT α . Sin embargo, no existe en la bibliografía un estudio conciso de la afinidad y actividad de estos vTNFRs.

Son muy pocos los datos moleculares que existen acerca del funcionamiento de estos vTNFRs. Hasta la fecha, sólo ha sido resuelta la estructura de CrmE (Graham y cols., 2007). Esta estructura confirma el elevado grado de similitud estructural que estas proteínas guardan con los receptores celulares, especialmente con TNFR2. En general, la estructura de CrmE sugiere un mecanismo molecular muy similar al llevado a cabo por los TNFSFRs para la unión de TNF α .

CrmB y CrmD, a diferencia de CrmC y CrmE, presentan un dominio C-terminal extendido cuya secuencia carece de cualquier similitud con alguna proteína celular conocida. De hecho, en nuestro laboratorio se demostró que el dominio C-terminal de CrmB era en realidad un dominio de unión a CKs que se denominó SECRET (Alejo y cols., 2006). Además, se han encontrado dominios SECRET independientes en otras tres proteínas muy representadas en los genomas de poxvirus, son las llamadas SECRET domain Containing Protein-1 (SCP1), SCP2 y SCP3 (Figura 8). Estas SCPs, interaccionan con el mismo tipo de CKs que se unen al dominio SECRET de CrmB o CrmD (Alejo y cols., 2006). Este dominio, constituye una familia de vCKBPs que, a diferencia de otras familias, es capaz de unir un grupo muy reducido de CKs, lo que sugiere una implicación directa de esas CKs en la patogénesis de estos poxvirus.

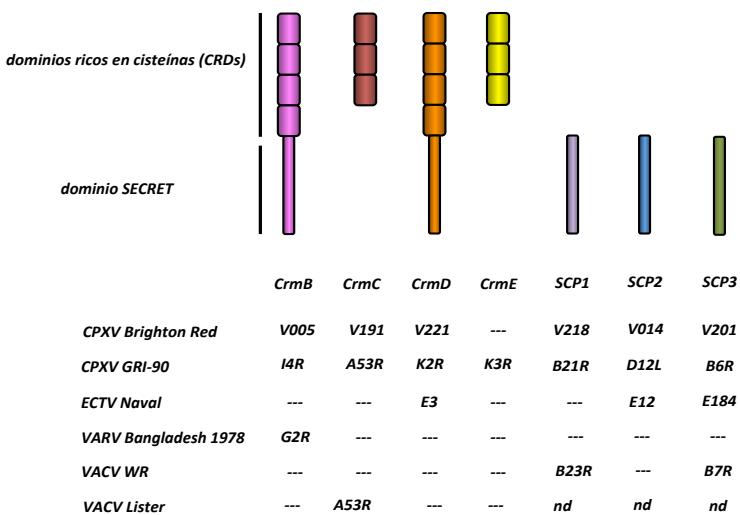


Figura 8. Distribución de CrmB, CrmC, CrmD y CrmE y SCPs en los genomas de Orthopoxvirus. Se indica el nombre de los genes para cada virus. Nd, no descrito.

1.3.2.2 Expresión de vTNFBPs

Los Yatapoxvirus son poxvirus que infectan únicamente primates, provocando una enfermedad autolimitante con fiebre, lesiones en la piel e inflamación de los ganglios linfáticos. Dentro de este género se encuentran el YLDV o el virus Tanapox (TPXV).

Se encontró que los sobrenadantes de células infectadas con TPXV contenían un polipéptido de 38 kDa capaz de unir TNF, IL-2, IL-5 e IFN γ (Paulose y cols., 1998). Sin embargo, no se identificó ningún homólogo de los TNFSFRs en las secuencias de estos virus (Lee y cols., 2001). Posteriormente, se caracterizó una proteína secretada de 45 kDa, identificada como la proteína 2L, con capacidad de unir hTNF α con una afinidad de 43 pM (Brunetti y cols., 2003). Ortólogos de este gen de TPXV se encontraron también en YLDV, el virus Swinepox (SPXV) y en DPXV. 2L une de manera muy específica hTNF α , no detectándose unión con ningún otro TNFSFL ni otra citoquina. Esta proteína carece de las típicas repeticiones CRDs de los vTNFRs, pero presenta similitud con los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de la cadena pesada del complejo MHC-I. En consonancia con esta observación, se describió que la proteína 2L de TPXV se coexpresaba con la cadena $\beta 2$ microglobulina humana (Rahman y cols., 2009), presente en los complejos de MHC-I de superficie. Esto animó a sugerir que además de bloquear el TNF α , 2L podría tener otras funciones inmunomoduladoras relacionadas con los procesos de presentación antigénica.

La estructura de la proteína 2L de YLDV en complejo con el TNF α ha sido resuelta recientemente (Yang y cols., 2009). Este trabajo confirma la similitud estructural de esta proteína con MHC-I, sin embargo, no se consiguió coexpresar con la microglobulina humana. 2L es un buen ejemplo de cómo los virus han sido capaces de captar genes de sus hospedadores para moldearlos en fin de una nueva función que asegure su supervivencia.

1.3.3 El TNF α y las CKs en la enfermedad

El TNF α se encuentra detrás de la patogénesis de numerosos trastornos inflamatorios sufridos por millones de personas en todo el mundo. Enfermedades como la artritis reumatoide, psoriasis, vasculitis, artritis crónica juvenil, espondilitis anquilosante o la enfermedad de Crohn están siendo tratadas mediante inhibidores del TNF α con cierto grado de éxito (Wong y cols., 2008).

Hoy en día existen cinco medicamentos aprobados para la clínica: Etanercept, adalimumab, infliximab, certolizumab y golimumab (Tak y Kalden, 2011). Todos, excepto etanercept, consisten en la aplicación de anticuerpos anti-TNF α de distinta naturaleza. Etanercept es una versión soluble de un dímero del TNFR2 fusionado a una porción Fc de una IgG humana. Etanercept, adalimumab y infliximab son los tratamientos más extendidos entre la población mundial con 500.000, 370.000 y 1.136.000 pacientes respectivamente (Tak y Kalden, 2011).

De la inhibición del TNF α se desprenden, con cierta frecuencia, efectos secundarios que, en algunos casos, ponen en riesgo la vida del paciente. Se han registrado casos de consumidores de estos medicamentos que han sufrido infecciones bacterianas y fúngicas como candidiasis, listeriosis o aspergilosis (Tsiodras y cols., 2008). Más preocupante ha sido observar casos de reactivación de la tuberculosis o predisposición a esta enfermedad por causa de la inhibición de la respuesta del TNF α (Kim y cols., 2011). Estos datos resaltan la importancia de esta citoquina en la respuesta inmunológica y obligan al desarrollo de medicamentos más selectivos para el bloqueo de sólo aquellas actividades del TNF α implicadas en el desarrollo de la enfermedad inflamatoria. Se ha descrito que la señalización del tmTNF α es suficiente para la defensa frente a *Mycobacterium tuberculosis* (Saunders y cols., 2005), por ello los esfuerzos se centran en diseñar drogas que actúen específicamente contra la forma soluble de la citoquina. Recientemente, se ha diseñado una molécula de TNF α con propiedades de dominante negativo (Steed y cols., 2003; Zalevsky y cols., 2007). Al trimerizar con otras dos moléculas de TNF α evita la señalización sin afectar a las funciones del tmTNF α .

Al ser el TNF α una molécula con gran implicación en la respuesta inmunológica, es ciertamente sorprendente que su inhibición resulte exitosa para el tratamiento de las comentadas enfermedades inflamatorias. Es importante conocer bien los mecanismos por los cuáles los inhibidores del TNF α median sus efectos farmacológicos para poder diseñar en el futuro medicamentos con actividades muy concretas. A este respecto, el estudio molecular y funcional de las estrategias virales para la inhibición del TNF α , puede proporcionar información muy valiosa para el diseño de mejores drogas y más efectivas, al combinarlas, como hacen los poxvirus, con otras moléculas inmunomoduladoras de otros componentes de la respuesta inflamatoria como por ejemplo, las CKs.

Las CKs son las principales responsables del reclutamiento de células inflamatorias a los órganos, por lo tanto, el bloqueo de la respuesta inducida por las CKs podría ser una buena diana terapéutica para el tratamiento de algunas enfermedades inflamatorias (Garin y Proudfoot, 2011). De hecho, el estudio de la patogénesis de algunos de estos trastornos ha otorgado relevantes implicaciones a algunas CKs y sus correspondientes CKRs. Por ejemplo, CCR2, CX3CR1 y CCR5 está involucrados en distintas fases del desarrollo de arterioesclerosis atrayendo y reteniendo células inflamatorias en las placas arteriales (Tacke y cols., 2007). La inhibición combinada de estos CKRs en modelos animales de hipercolesterolemia, fue eficaz en el bloqueo de la aparición de arteriosclerosis en estos animales (Combadiere y cols., 2008). Numerosos CKRs han sido relacionados con la patogénesis de la artritis reumatoide, entre los que se incluyen CXCR1/2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CCR1, CCR2, CCR5, CCR6 y CX3CL1 (Garin y Proudfoot, 2011). La inhibición de los ligandos de CXCR2 mediante la administración de la CKBP de garrapatas, evasina-1, en un modelo animal de artritis reumatoide, redujo, significativamente, el reclutamiento celular en las articulaciones y el dolor (Deruaz y cols., 2008). Estos resultados demuestran la validez de las terapias anti-CKs para el tratamiento de estas enfermedades inflamatorias.

Por lo tanto, la adición del dominio SECRET para el bloqueo de las CKs, a las terapias anti-TNF α , podría reportar importantes beneficios terapéuticos, en enfermedades como la artritis reumatoide, en la que tanto TNF α como CKs desarrollan funciones patogénicas.

1.4 Inmunopatogénesis de ECTV

Se han desarrollado numerosos modelos de poxvirus para poder comprender por qué el sistema inmunológico humano fue incapaz de frenar la infección de VARV (Chapman y cols., 2010). De todos ellos, *mousepox* es el modelo más extendido. Su principal ventaja es que supone la infección del hospedador natural de ECTV, provocando la muerte a muy bajas dosis, lo que ofrece un mayor rango experimental para el análisis de los efectos de delección de genes virales. Además, igual que VARV es un virus humano, ECTV es un virus muy virulento específico de ratón, con lo que es un modelo más cercano a la viruela que otros como MPXV y CPXV, que poseen un rango más amplio de hospedadores. Además, el ratón es un animal del que se conocen numerosos factores genéticos e inmunológicos, lo que hace fácil la interpretación de los resultados en este modelo. ECTV y VARV poseen mecanismos de inmunomodulación muy similares. Por ejemplo, ambos codifican por un único vTNFR, CrmD y CrmB, respectivamente. Tanto VARV como ECTV expresan una vIFN-IBP, codificada por los genes *B17R* y *E194*, respectivamente. Por lo tanto, *mousepox* es también un buen modelo para el estudio de genes inmunomoduladores de VARV mediante la generación de mutantes de delección en ECTV.

Ante el riesgo de una nueva epidemia provocada por poxvirus, bien sea por la liberación accidental de VARV o por la adaptación al hombre de virus animales como MPXV, es necesario el estudio de la patogénesis de esta familia de virus para el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico y vacunación. Además, supone una oportunidad única para entender cómo nuestro sistema inmunológico reacciona frente a infecciones virales agudas (OMS, 2010)

1.4.1 El modelo de *mousepox*

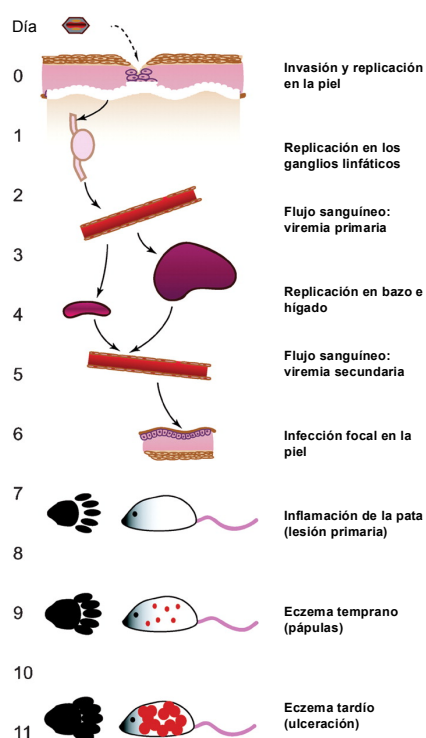


Figura 9. Etapas en el curso de una infección por ECTV. Adaptación de Fenner (1948) en Esteban y Buller (2005).

Históricamente, *mousepox* ha sido un modelo ampliamente utilizado para el estudio de enfermedades exantemáticas, así como para ahondar en el conocimiento de la patogénesis de Poxvirus, especialmente de VARV y de las infecciones virales en general (Esteban y Buller, 2005; Fenner, 1981). En una infección natural, a diferencia de VARV que es un virus respiratorio, ECTV infecta al hospedador a través de abrasiones de la piel y comienza a replicar en los ganglios linfáticos que drenan el sitio de infección. Desde allí, acceden al torrente sanguíneo provocando una primera viremia y alcanzando otros órganos, principalmente bazo e hígado. En los órganos linfoides secundarios el virus consigue replicar masivamente provocando la necrosis de los tejidos que acaba matando al animal. En caso de sobrevivir, se produce una segunda viremia que provoca una infección sistémica que termina afectando a la piel dando lugar a una fuerte reacción inflamatoria y a la aparición de las clásicas pápulas ulcerosas (Esteban y Buller, 2005). Estas fases en la patogénesis de ECTV fueron descritas por Fenner en 1948 (Fenner, 1948) y se muestran esquematizadas en la Figura 9.

1.4.2 La respuesta inmunológica frente a ECTV

Mousepox es el modelo típicamente utilizado para el estudio de una infección de virus muy virulentos. Todas las cepas de ratón se infectan con ECTV, sin embargo desarrollan diferentes grados de la enfermedad. Ante la ruta de transmisión natural de ECTV, a través de abrasiones en la piel, existen cepas susceptibles como BALB/c o DBA/2 que exhiben un 100% de mortalidad, mientras que otras más resistentes como C57BL/6 (B6) sobreviven a la infección mostrando pocos síntomas (Buller, 1985; Esteban y Buller, 2005). El estudio de las diferencias inmunológicas entre unas cepas y otras ha permitido establecer cuáles son las claves para la defensa frente a una infección viral como ECTV.

La resistencia a *mousepox* de B6 es el resultado de la acción conjunta de fagocitos mononucleares, IFNs, anticuerpos y la acción efectora de células NK y linfocitos CD8 citotóxicos (CTLs) (Karupiah y cols., 1996; Mullbacher y cols., 1999a; Mullbacher y cols., 1999b). Así, tanto la respuesta innata como la adaptativa juegan un papel importante frente a las infecciones de poxvirus. Dirigiendo todos estos procesos se encuentran las citoquinas. De hecho, se ha asociado la producción de citoquinas como IFN α , IFN γ , TNF α , IL-2 o IL-12 con la inducción de una fuerte respuesta celular en las primeras fases de la infección, dando lugar a la respuesta Th1 (Mosmann y Sad, 1996). Por otro lado, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 se asocian con la respuesta Th2, caracterizada por la inducción de la respuesta humoral (Mosmann y Coffman, 1989). La respuesta Th1 es vital para la eliminación de patógenos intracelulares como los virus. Personas con defectos genéticos relacionados con la respuesta Th1 manifiestan mayor predisposición a infecciones por *Mycobacterium*, una bacteria intracelular (Ottenhoff y cols., 2002). A este respecto, se ha observado que las cepas resistentes a *mousepox* desarrollan una potente respuesta Th1 en contraste con las cepas susceptibles que presentan respuestas celulares muy débiles (Chaudhri y cols., 2004). Tras la infección, los ratones B6 exhiben una respuesta de IFN γ , TNF α , IL2 e IL-4 con mayores niveles y más prolongada que los ratones BALB/c, que sólo comparan con B6 en la producción de IL-4, citoquina propia de la respuesta Th2. Por lo tanto, parece que lo que determina que unas cepas resistan y otras sucumban ante ECTV son las diferencias en el tipo de reacción celular frente al patógeno, por lo que los componentes de esta respuesta, linfocitos T y células NK, son esenciales para la defensa frente a poxvirus.

1.4.2.1 Respuesta innata

Aunque las funciones de la respuesta celular Th1 en la defensa frente a ECTV desempeñan un importante papel, por sí mismas no son suficientes para garantizar la supervivencia ante una infección por este virus. A diferencia de virus como influenza o papiloma, que provocan infecciones localizadas en el tracto respiratorio y en la piel respectivamente, ECTV produce una enfermedad sistémica (Esteban y Buller, 2005). Cuando ECTV infecta a través de la piel, lo primero que se produce es una replicación viral en el sitio de entrada seguida de la llegada del virus a los ganglios linfáticos locales. El virus replica en los ganglios y se expande por los vasos linfáticos eferentes para acabar llegando al torrente sanguíneo y a los órganos diana donde el virus replica masivamente provocando la necrosis y fallo del órgano (Figura 9).

La respuesta innata es importante para controlar las primeras fases de la infección frenando la llegada del virus a sus órganos diana y promoviendo una eficiente respuesta adaptativa posterior (Tsuru y cols., 1983). De hecho, ratones B6 deficientes en **macrófagos** sucumben a ECTV a los 8 días de la infección, con una elevada carga viral en el bazo y el hígado (Karupiah y cols., 1996). Esto sugiere que los macrófagos constituyen una parte importante de la resistencia a *mousepox* propia de los ratones B6. Se ha observado en los ratones deficientes en macrófagos una respuesta CTL muy reducida, lo que sugiere un papel de los macrófagos en la activación de la respuesta adaptativa. Además, recientemente, se ha descrito en un modelo de infección con VACV, que neutrófilos y monocitos son reclutados rápidamente tras la infección al sitio de entrada del virus, no sólo para limitar su expansión, sino para reducir el daño tisular generado por la propia respuesta innata (Fischer y cols., 2011).

Otro componente esencial de la respuesta innata son las **células NK**. La habilidad de estas células para eliminar células tumorales o infectadas por un virus depende en gran medida de la interacción de receptores de las células NK con ligandos en la célula diana. La actividad de las células NK viene determinada por el

balance de las señales inhibitoras y las activadoras que reciben a través de sus receptores. Estudios genéticos de las cepas de ratones resistentes a ECTV en comparación con las susceptibles, revelaron cuatro genes determinantes de la resistencia a *mousepox*, uno de los cuales, *rmp-1*, está vinculado genéticamente al complejo NK del cromosoma 6 (Delano y Brownstein, 1995). Se postula que *rmp-1* codifica un receptor de células NK y aunque se pensó que se trataba del receptor activador NK1.1 (Brownstein y Gras, 1997), posteriormente se observó que este receptor era completamente dispensable para la resistencia a *mousepox* de ratones B6 (Fang y cols., 2008).

La importancia de las células NK en la defensa anti-viral está ampliamente demostrada (French y Yokoyama, 2003). Personas con defectos en la respuesta NK enferman e incluso llegan a sucumbir ante infecciones que normalmente no suponen un elevado riesgo para la salud como varicela zóster o el citomegalovirus humano (Biron y cols., 1989; Etzioni y cols., 2005). Igualmente, ratones B6 deficientes en células NK se vuelven susceptibles a la infección por el citomegalovirus murino (Bukowski y cols., 1984) y ECTV (Parker y cols., 2007). Se ha determinado que, ante una infección por ECTV, los picos de actividad NK suceden en los ganglios linfáticos a las 48 h de la infección y en los órganos diana del virus, hígado y bazo, a los 6 días (Parker y cols., 2007). Sin embargo, se sabe que tras los primeros cuatro días de la infección, las células NK pasan a ser prescindibles (Fang y cols., 2008). Ratones B6 deplecionados de células NK a los 6 días postinfección sobrevivieron a la enfermedad. Por lo tanto, las células NK son vitales durante las primeras fases de la infección, limitando, desde los ganglios, la carga viral que posteriormente alcanza otros órganos importantes. Pero también regulan la respuesta celular posterior. Se ha visto que en ausencia de NK la respuesta CTL es más débil (Parker y cols., 2007).

1.4.2.2 Respuesta adaptativa

Después del cuarto día de la infección la actividad NK es completamente prescindible y el peso de la defensa frente a ECTV cae en la respuesta adaptativa. Los **linfocitos CD8+** son parte muy importante de esta respuesta, como demuestra el hecho de que ratones B6 carentes de CD8+ mueran ante la infección por ECTV a los 10 días (Karupiah y cols., 1996). Una vez que el virus alcanza el bazo e hígado, es la respuesta CTL la que toma el relevo en la defensa frente a ECTV. De hecho, las cepas resistentes y susceptibles a *mousepox* se diferencian claramente por la fuerte respuesta CTL localizada en el bazo que ocurre, en los primeros, a los 7 días de la infección (Chaudhri y cols., 2004). Aunque las células NK son las principales responsables de frenar al virus en los ganglios linfáticos los primeros días de la infección, se ha observado que la transferencia de células CD8 de memoria de animales infectados con ECTV o VACV puede inmunizar a ratones susceptibles BALB/c frente a ECTV, limitando la llegada del virus a los órganos vitales incluso antes del inicio de la respuesta CTL en estos órganos (Xu y cols., 2007b).

Mucho más tarde, a la cuarta semana de la infección es cuando los **anticuerpos** y la respuesta humoral comienzan a tener su importancia frente a ECTV. Como en las infecciones crónicas del virus de la coriomeningitis linfocítica (Brundler y cols., 1996), los anticuerpos son esenciales para eliminar completamente la persistencia de ECTV en el hospedador. Sin ellos, ratones resistentes B6 sucumben a los 40 días de la infección, un fenotipo que se recupera con la transferencia de células B o antisero frente a ECTV (Fang y Sigal, 2005). La importancia de esta respuesta humoral, se vio también en el hecho de que la transferencia de células CD8 de memoria no protegiese de *mousepox* a animales delecionados de células B.

Bajo la regulación de ambas repuestas, la celular y la humoral, radica la importancia de los **linfocitos CD4**. En ausencia de CD4 aunque los animales sobreviven en las primeras fases de la infección acaban sucumbiendo posteriormente. Sin CD4, el virus alcanza títulos significativamente mayores en los órganos vitales debido principalmente a una respuesta CTL claramente reducida. La importancia de este tipo celular se resalta también por el hecho de que el doble mutante deficiente en CD8 y CD4 muere antes que los carentes de CD8 ante una infección de ECTV (Karupiah y cols., 1996).

Por lo tanto, se ha conseguido esclarecer los pasos más importantes en la defensa frente a ECTV. Los fagocitos mononucleares son los primeros en responder para evitar que el virus abandone el sitio de infección. A los pocos días, las células NK se activan en los ganglios locales para eliminar las células

infectadas con el virus y limitar así la expansión viral a los órganos vitales. Al tiempo que realizan sus funciones efectoras, las células NK y monocitos preparan y activan a la respuesta celular que estará regulada por las células CD4. En el bazo e hígado la respuesta CTL mediada por las células CD8 son quienes defienden al organismo de la infección y mucho más tarde los anticuerpos entran en acción para cooperar en la resolución definitiva de la enfermedad.

1.4.3 Papel en patogénesis de genes inmunomoduladores de ECTV

Como se ha explicado, los componentes de la respuesta celular y humoral son igualmente importantes en la defensa frente a ECTV. En los ratones susceptibles como BALB/c, ECTV consigue bloquear la débil reacción de tipo Th1 de este hospedador tan importante en la defensa contra este patógeno. En este contexto, se ha podido analizar la contribución de la regulación inmunológica de algunos genes de ECTV.

El IFN γ es una citoquina que forma una parte importante de la respuesta innata y de las funciones efectoras de células NK. Es una molécula importante en la defensa frente a Poxvirus ya que ratones resistentes B6 se vuelven susceptibles a ECTV cuando son delecionados de IFN γ (Karupiah y cols., 1993). Para contrarrestar su acción, VARV, ECTV y VACV expresan una proteína, **vIFN γ R**, similar al receptor celular de esta citoquina. Modelos de infección con recombinantes de VACV carentes de la vIFN γ R han dado resultados contradictorios (Symons y cols., 2002; Verardi y cols., 2001). Sin embargo, el virus ECTV Δ vIFN γ R manifestó un fenotipo discreto pero significativamente atenuado respecto al virus parental en ratones susceptibles, con una supervivencia del 90% de los animales infectados con 500 ufp (Sakala y cols., 2007), sugiriendo un papel para esta proteína en la modulación de la respuesta del hospedador *in vivo*.

Detrás de la inducción del IFN γ se encuentran la IL-18 y la subunidad p40 de la IL-12 y la IL-23 (Yoshimoto y cols., 1997). Ratones B6 deficientes en IL-18 y IL-12 fueron susceptibles a la infección subcutánea con altas dosis de ECTV con un menor nivel de citoquinas asociadas a la respuesta Th1 y respuesta CTL y NK reducida (Wang y cols., 2009). ECTV ha diseñado una molécula, similar a la proteína reguladora de la actividad de la IL-18, la IL-18BP, para inhibir los efectos de esta IL. Se ha demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que la **vIL-18BP** es capaz de atenuar la actividad NK pero no parece ser un factor de virulencia esencial en la patogénesis de ECTV en este modelo (Born y cols., 2000).

Por contra, la **vIFN-IBP** resultó ser un factor de virulencia esencial en ECTV (Xu y cols., 2008). El IFN de tipo I es importante para el establecimiento de un estado anti-viral en las células y limitar así la infectividad del virus. Ratones B6 resistentes a ECTV, son susceptibles a la infección cuando son delecionados de los receptores celulares del IFN de tipo I (Gratz y cols., 2011). La eliminación de la vIFN-IBP de VACV, B18, resultó en una atenuación de dos órdenes de magnitud en la DL₅₀ en un modelo intranasal (Symons y cols., 1995). Sin embargo, en ECTV supuso una atenuación mayor a 7 órdenes de magnitud en comparación con el virus parental en ratones susceptibles infectados por vía subcutánea (Xu y cols., 2008). Además, la administración de vIFN-IBP recombinante previa a la infección con ECTV protegió a los animales (Xu y cols., 2008). De igual forma, el suero de ratones inmunizados con vIFN-IBP recombinante protegió de la infección a ratones susceptibles. Un estudio reciente demuestra que la vIFN-IBP inhibe localmente en el hígado y bazo el efecto anti-viral del IFN de tipo I favoreciendo la replicación de ECTV (Xu y cols., 2012). Este estudio también demuestra que el tratamiento con anticuerpos contra la vIFN-IBP protege a los ratones infectados con ECTV, planteando la posibilidad de diseñar estrategias frente a proteínas inmunomoduladoras para proteger de infecciones de poxvirus.

N1 es una proteína codificada por VACV, ECTV y VARV similar al factor antiapoptótico Bcl-2 y se piensa que podría bloquear la apoptosis celular para permitir la expansión del virus (Aoyagi y cols., 2007). La atenuación de ECTV Δ N1 observada por inoculación intranasal, fue similar a la obtenida en un modelo de VACV (Bartlett y cols., 2002). ECTV Δ N1 es además incapaz de abandonar los pulmones ya que durante la infección no se detectó carga viral en los órganos linfoides secundarios (Gratz y cols., 2011). Esto sugiere que en ausencia de N1, el virus es eliminado rápidamente de los pulmones por la respuesta innata. Sin embargo, la atenuación observada fue moderada, de dos órdenes de magnitud respecto al virus parental.

CrmA es una proteína implicada en la inhibición de la cascada de las caspasas que afecta tanto a las señales de apoptosis, como a los procesos inflamatorios en los que las procitoquinas necesitan ser procesadas por caspasas para dar lugar a las formas activas (Kettle y cols., 1997). Un mutante de ECTV deficiente en este gen dio lugar a un fenotipo atenuado en el que el 80% de los animales infectados por vía subcutánea sobrevivieron (Melo-Silva y cols., 2011). Sin embargo, la depleción de las células NK revirtió el efecto y todos los animales sucumbieron a la infección por el mutante de delección. Esto sugiere, que el efecto de CrmA podría estar focalizado en reducir la actividad de las células NK.

El papel del vTNFR homólogo del CD30 expresado por ECTV, **vCD30**, también ha sido estudiado *in vivo*. La delección de esta proteína no afectó a la virulencia de ECTV en un modelo intranasal (Alejo y cols., 2009).

Aunque es indiscutible el papel del TNF α en la defensa ante las infecciones virales, son pocos los datos que se tienen sobre su efecto en la respuesta inmunológica contra Poxvirus. El mejor ejemplo es el de **M-T2**, el vTNFR de MYXV, cuya delección supuso una atenuación moderada del virus en un modelo de conejos europeos (Upton y cols., 1991). Se ha sugerido que el TNF α tiene una función importante pero no tan esencial como el IFN γ . Ya que, mientras que la depleción de éste último tiene un efecto letal en ratones B6 infectados con ECTV, la inactivación del TNF α mediante anticuerpos específicos no evitó el establecimiento de fuertes respuestas NK y CTLs y la supervivencia de los ratones no se vio afectada (Chaudhri y cols., 2004). Sin embargo, la sobreexpresión de TNF α mediante un recombinante de VACV para la expresión de esta citoquina, controló la expansión viral, un fenotipo que probablemente se deba al efecto citotóxico local mediado por el TNFR1 (Sambhi y cols., 1991). Aunque la mayor parte de los procesos inmunológicos inducidos por el TNF α están mediados por el TNFR1 (Schluter y Deckert, 2000), en el caso de la defensa ante una infección por ECTV se le ha atribuido un papel especialmente importante al TNFR2. Ratones B6 deficientes en TNFR1, aunque mostraron síntomas más graves que los ratones parentales, sobrevivieron perfectamente a la infección por vía subcutánea, sin embargo, aquellos ratones que carecían del TNFR2 fueron altamente susceptibles, con un 80% de mortalidad al inocular 5.000 ufp (Ruby y cols., 1997). La importancia del TNFR2 va en consonancia con el hecho de que los vTNFRs de Poxvirus tengan un mayor grado de similitud con este receptor. Sin embargo, excepto algunos experimentos en el modelo de VACV y en muchos casos en presencia de otros inhibidores del TNF α , se conoce muy poco del papel que podrían tener en patogénesis, los vTNFRs, CrmB, CrmC, CrmD y CrmE.

La delección de **CrmB** en un modelo intracraneal de CPXV, resultó en una atenuación de casi dos órdenes de magnitud respecto al virus parental (Hu y cols., 1994). Sin embargo, este experimento intracraneal difícilmente puede reproducir la infección natural de este virus. Además, se estudió el efecto de la eliminación del gen de *CrmB* en un contexto en el que existen otros vTNFRs activos como CrmE y CrmC. Por lo tanto, aunque este resultado sugiere una función importante para CrmB, el modelo en el que se estudió no es el adecuado para determinar la importancia de esta proteína en patogénesis. El papel de **CrmE** y **CrmC** se ha estudiado en modelos de delección de los correspondientes genes de VACV cepa USSR (Reading y cols., 2002). En ambos casos se registró una leve atenuación del fenotipo viral, sin embargo, estos trabajos tenían el problema de partir de un virus parental muy atenuado y por lo tanto, poco margen para detectar cambios en la virulencia. En otra aproximación diferente, la incorporación de los genes de CPXV que codifican CrmB, CrmC o CrmE al genoma de un VACV cepa Western Reserve TK-, aportó un incremento marginal de la virulencia a un virus altamente atenuado (Reading y cols., 2002). Sin embargo, nuevamente, se trataba de un modelo muy limitado para el estudio de las funciones inmunomoduladoras de estos vTNFRs. **CrmD** es la única molécula anti-TNF α expresada por ECTV, un patógeno estricto de ratón. Por lo tanto, el estudio del efecto de la delección del gen de CrmD en un modelo en el que se utiliza el hospedador y la ruta de entrada natural de ECTV, podría aportar información relevante sobre el papel de este vTNFR en la patogénesis de *mousepox*.

2 OBJETIVOS

Los poxvirus han desarrollado multitud de estrategias para la regulación de la respuesta inmunológica de sus hospedadores. Mediante estos mecanismos, los virus consiguen evadir la respuesta anti-viral y garantizar su propagación y supervivencia. Por ejemplo, la expresión de receptores solubles o proteínas de unión a citoquinas, permiten a estos virus interferir con las funciones de factores tan importantes en la respuesta inmunológica como el TNF α o las CKs.

El TNF α es una molécula con importantes funciones proinflamatorias. Los poxvirus han diseñado distintas estrategias para el bloqueo de esta citoquina, lo que resalta su importancia en la respuesta anti-viral. Uno de estos mecanismos anti-TNF α es la expresión de vTNFRs, proteínas solubles que mimetizan el dominio de unión al ligando de los TNFRs celulares. Entre las especies de poxvirus, se han descrito cuatro tipos distintos de vTNFRs: CrmB, CrmC, CrmD y CrmE. Todavía no se entiende bien por qué estos vTNFRs son expresados de manera diferencial entre los distintos poxvirus. Así, mientras que virus con un amplio rango de hospedador, como algunas cepas de CPXV, contienen genes para la expresión de todos los vTNFRs, VARV, un virus exclusivamente humano y ECTV, que sólo infecta ratones, únicamente expresan CrmB y CrmD, respectivamente. Hasta la fecha, no se han conseguido datos definitivos que aclaren el papel de estos vTNFRs en la patogénesis de poxvirus.

A diferencia de CrmC y CrmE, CrmB y CrmD contienen además un dominio SECRET para la unión de un pequeño grupo de CKs. Por lo tanto, son proteínas con una doble actividad inmunomoduladora, anti-TNF α y anti-CKs. Se desconoce el papel de este dominio SECRET en la patogénesis de poxvirus, una familia de virus que ya contiene otros genes para la inhibición de las funciones de las CKs. Sin embargo, dado que el virus deletado de CrmD está altamente atenuado y que los únicos vTNFRs codificados por virus muy virulentos como VARV y ECTV, son precisamente CrmB y CrmD, la actividad del dominio SECRET podría resultar muy relevante para la propagación de estos virus en sus hospedadores.

Cada vez se conocen mejor las bases estructurales de la interacción del TNF α con sus TNFRs celulares. Sin embargo, existe muy poca información acerca de la unión de los vTNFRs al TNF α . La caracterización de las estrategias moleculares llevadas a cabo por los vTNFRs para inhibir el TNF α , podría aportar datos de gran relevancia para el diseño de nuevas drogas utilizadas en el tratamiento de algunos trastornos inflamatorios mediados por el TNF α . En este mismo sentido y tomando como referencia las proteínas de poxvirus, CrmB y CrmD, la adición de un dominio SECRET a los medicamentos anti-TNF α podría aportar importantes ventajas terapéuticas. Para ello, se necesita conocer muy bien las características moleculares, así como el papel en patogénesis de este dominio anti-CKs.

En este escenario, los objetivos planteados en esta Tesis fueron los siguientes:

1. Determinar los posibles ligandos de CrmD y caracterizar sus propiedades de unión.

Se purificaron proteínas recombinantes correspondientes a la secuencia de CrmD completa, al dominio anti-TNF α y al anti-CK, y se pusieron a punto ensayos para estudiar sus propiedades de unión e inhibición de la actividad de los distintos ligandos.

2. Estudiar las características moleculares de la interacción de TNFSFLs-CrmD

Mediante mutagénesis dirigida, se generó una amplia colección de mutantes puntuales a lo largo de todo el dominio anti-TNF α y se analizó la unión y la actividad *in vitro* con los TNFSFLs.

3. Caracterizar las diferencias de especificidad y afinidad por TNFSFLs de los distintos vTNFRs de poxvirus.

Se clonaron y purificaron los cuatro tipos de vTNFRs y se determinaron tanto las propiedades de unión a los distintos TNFSFLs mediante SPR, como la capacidad de inhibir la actividad citotóxica de los mismos.

4. **Estudiar la posibilidad de que CrmD se una a la superficie celular interaccionando con GAGs, como ocurre para otras proteínas inmunomoduladoras de poxvirus.**

Mediante ensayos de SPR, inmunofluorescencia y citometría de flujo, se analizó la capacidad de CrmD para retenerse en las superficies ricas en GAGs

5. **Determinar la contribución de cada una de las actividades de CrmD, anti-TNF α y anti-CK, en la patogénesis de ETCV mediante un modelo de infección *in vivo*.**

Se generaron virus recombinantes y se infectaron ratones susceptibles con el fin de estudiar la función inmunomoduladora de CrmD y de cada uno de sus dominios en el modelo de *mousepox*.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Líneas celulares

La generación, amplificación y titulación de los stocks de baculovirus recombinantes se realizaron en células de insecto *Spodoptera frugiperda* Sf9 adherentes mantenidas en cultivo en medio TC100 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS, Sigma), 2 mM de L-glutamina (Sigma) y antibióticos, 100 µg/ml de una mezcla de antibióticos penicilina-estreptomicina (Sigma) y 25 µg/ml de gentamicina (Sigma). La expresión de proteína recombinante se hizo en células de insecto Hi5 en suspensión, mantenidas en medio Express Five (Gibco) con 8 mM de L-glutamina y antibióticos. Ambas líneas celulares se cultivaron a 27°C.

Para el trabajo con ECTV, tanto en la generación de virus recombinantes, como en la titulación de los *stocks* o la obtención de sobrenadantes de células infectadas con este virus, se utilizaron células BS-C-1 (células de epitelio renal de mono verde africano) que se crecieron a 37°C, 95% de humedad relativa (HR) y 5% CO₂ en medio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) suplementado con 10% de FCS, 2 mM de L-glutamina y antibióticos.

Las líneas celulares, L929 (fibroblastos de ratón) y RAW267.3 (macrófagos de ratón) se mantuvieron en cultivo a 37°C, 95% HR y 5% CO₂ en medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% FCS, 2 mM de L-glutamina y antibióticos. Estas células se utilizaron, respectivamente, para experimentos de citotoxicidad y los estudios de la actividad del tmTNFα.

Para los ensayos relacionados con el análisis de las uniones a GAGs se utilizaron las líneas derivadas de ovario de hámster, CHO-K1 y sus mutantes para la expresión de GAGs en superficie, CHO-618 (mutación en la enzima galactosiltransferasa) y CHO-745 (mutación en la enzima xilosiltransferasa). Estas líneas se crecieron en medio DMEM: F12-HAM (Gibco), 1:1 (v/v), debidamente suplementado con 10% de FCS, 2 mM de L-glutamina y antibióticos, a 37°C, 95% HR y 5% CO₂.

Las células MOLT4 (linfocitos T humanos), A20 (linfoma B de ratón) y MonoMac1 (monocitos humanos) usadas en los ensayos de quimiotaxis, se crecieron en medio RPMI 1640 (MP Biomedicals) suplementado con 10% FCS, 2 mM de L-glutamina y antibióticos, a 37°C, 95% HR y 5% CO₂.

3.2 Virus

Para la expresión de proteína recombinante, el gen correspondiente se introdujo mediante recombinación en el genoma del baculovirus de la polihedrosis múltiple nuclear de la polilla *Autographa californica*, bajo el promotor de la polihedrina.

Para los experimentos de la patogénesis de *mousepox*, se utilizó la cepa Naval.Cam del virus ectromelia (ECTV Naval.Cam). La secuencia completa del genoma de este virus puede consultarse en www.poxvirus.org. ECTV Naval.Cam se aisló, tras tres rondas de plaqueo consecutivas, de una placa de lisis en monocapa de células BS-C-1 infectadas con una preparación del bazo de un ratón infectado con el virus original, ECTV Naval, cedido por Mark Buller (University of St. Louis, USA). ECTV Naval.Cam mostró la misma DL₅₀ que ECTV Naval.

3.3 Citoquinas

Las citoquinas utilizadas en esta tesis se obtuvieron principalmente de las casas comerciales Peprotech y R&D Systems. Los viales se reconstituyeron en una solución de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10mM y KH₂PO₄ 2 mM) con 0,1% BSA a una concentración de 10 µM, a no ser que el fabricante aconsejase otras condiciones. Las citoquinas se guardaron a -80°C en alícuotas de 1 µM de un sólo uso. Por lo general, los productos de Peprotech se emplearon para ensayos de unión mientras que los de R&D Systems se utilizaron en ensayos de actividad y cálculo de afinidades. Para los ensayos de unión se utilizaron todos los TNFSFLs murinos y humanos comercialmente disponibles y un grupo reducido de CKs de ratón. En la Tabla 2 se detallan las citoquinas utilizadas, junto a sus receptores celulares.

Tabla 2. Listado de las citoquinas utilizadas. Se indican los TNFSFLs y las CKs utilizadas para el desarrollo de esta tesis. El nombre común de cada citoquina se acompaña de su nombre sistemático y sus receptores celulares conocidos.

nombre común	nombre sistemático	receptores	nombre común	nombre sistemático	receptores
TNFSFLs			CKs		
TNFβ/LTα	TNFSFL1	TNFR1, TNFR2, HVEM	I-TAC	CXCL11	CXCR3, CXCR7
TNFα	TNFSFL2	TNFR1, TNFR2	SDB1α	CXCL12α	CXCR4, CXCR7
LTβ (α1β2)	TNFSFL3A	LTβR, HVEM	SDF1β	CXCL12β	CXCR4, CXCR7
LTβ (α2β1)	TNFSFL3B	LTβR, HVEM	BCA1	CXCL13	CXCR5
OX40L	TNFSFL4	OX40	BRACK	CXCL14	desconocido
CD40L	TNFSFL5	CD40	MIP3α	CCL20	CCR6
FasL	TNFSFL6	Fas	SLC	CCL21	CCR7
CD27L	TNFSFL7	CD27	MDC	CCL22	CCR4
CD30L	TNFSFL8	CD30	MIP1F-2	CCL24	CCR3
4-1BBL	TNFSFL9	4-1BB	TECK	CCL25	CCR9
TRAIL	TNFSFL10	DCR1, DCR2, DR4, DR5	CTACK	CCL27	CCR10
RANKL	TNFSFL11	RANK	MEC	CCL28	CCR10
TWEAK	TNFSFL12	FN14			
APRIL	TNFSFL13A	BCMA, TACI			
BAFF	TNFSFL13B	BCMA, TACI, BAFFR			
LIGHT	TNFSFL14	HVEM, LTβR, DR3			
TL1A/VEGI	TNFSFL15	DR3			

3.4 Clonajes

El compendio de las construcciones realizadas, así como los oligonucleótidos utilizados en cada caso, se enumeran en las Tablas 3 y 4, respectivamente.

Tabla 3. Listado de las construcciones generadas. Se indica, de izquierda a derecha, el nombre de la construcción, el gen de clonaje con el nombre del virus y la cepa que lo codifica entre paréntesis y el número de acceso al GenBank. Además, se muestra el nombre de la proteína codificada en cada caso y el vector de origen de donde se extrajo el gen. La última columna indica el vector en el que se clonó cada gen.

Gen	GenBank	Proteína	Vector de origen	Vector de destino
pSP3 <i>E6</i> (ECTV Naval)	AJ567693	CrmD_ECTV	pMS1 (Saraiva and Alcamí, 2001)	pFastBac1
pSP4 <i>E6</i> (ECTV Naval)	AJ567693	CrmD163	pMS1	pFastBac1
pSP5 <i>E6</i> (ECTV Naval)	AJ567693	CrmD181	pMS1	pFastBac1
pSP6 <i>E6</i> (ECTV Naval)	AJ567693	CRD-CrmD	pMS1	pFastBac1
pSP8 <i>K3R</i> (CPXV Elephantpox)	AJ272008	CrmE_CPXV	pMS3 (Saraiva and Alcamí, 2001)	pFastBac1
pSP9 <i>CPXV191</i> (CPXV Brighton Red)	AAM13631	CrmC_CPXV	pRA112 (Alejo <i>et al.</i> , 2006)	pFastBac1
pSP10 <i>CPXV005</i> (CPXV Brighton Red)	AAA60952	CrmB_CPXV	pAH21	pFastBac1
pSP11 <i>CPXV221</i> (CPXV Brighton Red)	AAM13659	CrmD_CPXV	DNA viral	pFastBac1
pSP12 <i>G2R</i> (VARV Bangladesh 1975)	AAA60933	CrmB_VARV	pRA107 (Alejo <i>et al.</i> , 2006)	pFastBac1
pSP21 <i>E6</i> (ECTV Naval)	AJ567693	Mut4	pMS37	pMS30
pSP24 ---	---	CrmC-SECRET	pSP22	pFastBac1

El gen *E6* de ECTV Naval que codifica para la proteína CrmD (1-320), se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del vector pMS1 utilizando los oligonucleótidos 5'Crmd34 y 3'Crmd33 incorporando las dianas de BamHI y XhoI en 5' y 3', respectivamente. Así, se subclonó sin su péptido señal (21-320) en el vector pFastBac1, previamente digerido con BamHI y XhoI, de forma que el gen quedó en fase de lectura con el péptido señal de la melitina en 5' y con los tags V5 y 6xHis en 3' para facilitar su purificación por cromatografía de afinidad. El plásmido resultante de la ligación se nombró pSP3. La misma estrategia se siguió para el clonaje en este vector de las dos versiones cortas del dominio C-terminal de CrmD, CrmD163 (CrmD163-320) y CrmD181 (CrmD181-320), utilizando el mismo molde, los oligonucleótidos 5'Crmd36 y 5'Crmd31, respectivamente y el 3'Crmd33 en ambos casos, generándose así los plásmidos pSP4 y pSP5, respectivamente.

Igualmente, para el clonaje de la forma corta del dominio N-terminal de CrmD, CRD-CrmD (CrmD21-151), en el vector pFastBac1, se utilizaron los oligonucleótidos Crmd34 y Crmd87 para extraer el gen por PCR del molde pMS1. Tras la ligación del producto de PCR en el vector digerido con BamHI y XhoI se obtuvo el plásmido pSP6.

Un procedimiento similar se siguió para clonar en el vector pFastBac1 los otros vTNFRs, CrmE de CPXV cepa Elephantpox, CrmC, CrmD y CrmB de CPXV cepa Brighton Red y CrmB de VARV cepa Bangladesh 1975. Los genes correspondientes se amplificaron por PCR a partir de construcciones preexistentes en el laboratorio (Tabla 3), mediante una pareja de oligonucleótidos que añadiesen la diana BamHI en 5' y XhoI en 3' para posteriormente clonarlos en el pFastBac1 de la misma manera que lo anteriormente explicado. Las construcciones resultantes se denominaron pSP8, pSP9, pSP10, pSP11 y pSP12, respectivamente (Tabla 3). Todas estas construcciones clonadas en el vector pFastBac1 se utilizaron para la generación de baculovirus recombinantes.

Tabla 4. Oligonucleótidos. Listado de oligonucleótidos utilizados, indicando el nombre, la secuencia y la construcción final resultante de la ligación del producto de PCR. En la secuencia se subrayan los sitios de restricción incorporados en cada oligonucleótido: BamHI (GGATCC), XhoI (CTCGAG), EcoRI (GAATTC) y PstI (CTGCAG).

Oligonucleótido	Secuencia	Vector
Crmd27	CGGAATTCCGATTTAATAACATTGATTATATAG	pMS37
Crmd28	CTGCAGCTCTGTAATGATGGACGTTATTTTC	pMS37
Crmd31	CGCGGATCCGAATTCAATTCGAGTATATAGGAAGCAGCAGTAC	pSP5
Crmd33	GCGCTCGAGGCATCTCTTTCACAATCATTGG	pSP3
Crmd34	GCGGGATCCGATGTTCCGTATACACCCATTAATGGG	pSP3
Crmd36	GCGGGATCCTTTAACAGCATAGATGTAGAAATTAATATGTATCC	pSP4
Crmd87	GCGCTCGAGGCACATATTACATCTCCTTTAGATG	pSP6
5'Crme-Sp BamHI	GGCGGATCCATGAAATGTGAACAAGGTGTCTC	pSP8
3'Crme-Sp XhoI	GGCCTCGAGGCTCTTGTCTATTGGTTTACATTGATCAG	pSP8
5'CrnC-Sp BamHI	CCC GGATCC GATATACCTACTTCGTCACATGCC	pSP9
3'CrnC-Sp XhoI	GCGCTCGAGGCATTACATTTAGATAGTTTGCATGG	pSP9
5'CrnB CPXV-Sp BamHI	CGCGGATCCGATATAACACCGCATGAACCATCC	pSP10
3'CrnB CPXV-Sp XhoI	GCGCTCGAGGCTAAAAAGTGGGTGGGATACTGGG	pSP10
5'CrnD CPXV-Sp BamHI	GCGCGGATCCGATGTTCTTTATGAACACATTAATGG	pSP11
3'CrnD CPXV-Sp XhoI	GCGCTCGAGGCATCTCTTTCACAATCATTGGTGG	pSP11
5'CrnB VARV-Sp BamHI	GCGGGATCCGCACCGTATACACCAATGG	pSP12
3'CrnB VARV-Sp XhoI	GCGCTCGAGGCTAAAAAGCGGGTGGGTTTGG	pSP12

La construcción pSP24, para la expresión mediante baculovirus de una proteína CrmC fusionada al dominio SECRET de CrmD, se generó extrayendo por PCR el gen correspondiente del plásmido pSP22, que contenía esta fusión clonada en el vector pMS30. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos 5'CrnC-Sp BamHI y Crmd33 y pSP22 como molde. Seguidamente se subclonó el producto de PCR en el vector pFastBac1 en las dianas BamHI y XhoI. No se detalla el clonaje de pSP22 ya que para esta tesis sólo se utilizó como molde de esta PCR.

Los mutantes puntuales de CrmD se realizaron utilizando el kit *Quik Change Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies). Este kit permite realizar mutaciones dirigidas siguiendo un protocolo sencillo. Brevemente, tomando como molde el vector pSP3 (CrmD en pFastBac1) en el que se encuentra clonado el

gen diana, se realizó una PCR con dos oligonucleótidos complementarios que contienen la mutación deseada. De esta manera se copió todo el vector incorporando la mutación. A continuación, se digirió con la enzima DpnI el DNA original que, por encontrarse metilado, es susceptible a la digestión y se transformaron bacterias ultracompetentes XL1Gold. Finalmente, se comprobó la incorporación de la mutación por secuenciación del DNA extraído de colonias individuales. En la Tabla 5 se muestra la lista de oligonucleótidos utilizados para la generación de los mutantes puntuales de CrmD. Siguiendo este mismo protocolo, se obtuvo el mutante N77F (Mut4) sobre el plásmido pMS37 que contiene el gen *E6* (CrmD) de ECTV cepa Naval acompañado de sus regiones genómicas flanqueantes. Como resultado de la mutación se generó el plásmido pSP21 que fue utilizado para la obtención de un virus ECTV recombinante que expresase la proteína Mut4.

Tabla 5. Listado de oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis dirigida del gen *E6* de ECTV. Se muestra el nombre de cada oligonucleótido, para qué mutante se utilizó y el cambio de aminoácido que introduce. En la secuencia de bases de cada oligonucleótido se resalta en rojo las bases que son distintas respecto al molde original.

NOMBRE	MUTANTE	MUTACIÓN	SECUENCIA
CrmD37	Mut1	K44A	GGTACAGACTATAACAGTAATAATCTATGTTGTG GC ACAATGCAATCCTGGAAT
CrmD38	Mut1	K44A	ATTCCAGGATTGCATTGT GC ACAACATAGATTATTACTGTTATAGTCTGTACC
CrmD39	Mut2	P68A	TACAAAATGTGACAAGTGC GC CAGATGACACCTTTACATC
CrmD40	Mut2	P68A	GATGTAAAGGTGTCTATCTG CG CACCTTGTACATTTTGTGTA
CrmD41	Mut3	N77A	AGATGACACCTTTACATCCATTCCT GC TCATAGTCCCGCGTG
CrmD42	Mut3	N77A	CACGCGGGACTATGA GC AGGAATGGATGTAAAGGTGTCATCT
CrmD43	Mut4	N77F	AGATGACACCTTTACATCCATTCCT TTT TCATAGTCCCGCGTG
CrmD44	Mut4	N77F	CACGCGGGACTATGA AA AGGAATGGATGTAAAGGTGTCATCT
CrmD45	Mut5	Q93A/E95A	AAGTTGTCGAGGCAAAATGTAGCAGTAAT GC AGTAG GC ACTAAATCGTGTAGTAAC
CrmD46	Mut5	Q93A/E95A	GTTACTACACGATTAGT GC CTACT GC ATTACTGTCTACATTTGCCCTCGACAACCTT
CrmD47	Mut6	Q103A/D104A/R105A	GTAATCAAGTAGAGACTAAATCGTGTAGTAACACA GC GG CC GCAGTATGTCTGTGTCATC
CrmD48	Mut6	Q103A/D104A/R105A	GATGCACAGACACATACT GC GG CC GCCTGTGTACTACACGATTTAGTCTCTACTTGTATTAC
CrmD49	Mut7	Y141A/S142A/S143A	GTGGTTCTGGTTACGGTGTATATGGC GC CG AG CTAAAGGAGATGTAATATGTAAGAAAGT
CrmD50	Mut7	Y141A/S142A/S143A	ACTTTTTACATATTACATCTCCTTTAG CTG CGGC GCCATATACACCGTAACCCAGAACCCAC
CrmD51	Mut8	D35A/Y36A	CCCATTAAATGGGAAATGTAAACGGTACAG CC GC TAACAGTAATAATCTATGTTGTAACAA
CrmD52	Mut8	D35A/Y36A	TTGTTTACAACATAGATTATTACTGT GC GGCTGTACCGTTACATTTCCCATTAATGGG
CrmD53	Mut9	F72A/T73A/S74A	GACAAGTGCCCGAGATGACAC CG CTG CA GCATTCCTAATCATAGTCCCG
CrmD54	Mut9	F72A/T73A/S74A	CGGACTATGATTAGGAATGG CTG CAG CGGTGTCTATCGGCACCTTGTG
CrmD55	Mut10	H78A/S79A	CCCAGATGACACCTTTACATCCATTCCTAAT GC TGC TCCCGCGTGTCTAAGT
CrmD56	Mut10	H78A/S79A	ACTTAGACACGCGGGA GCA GC ATTAGGAATGGATGTAAAGGTGTCATCTGGG
CrmD57	Mut11	R86A/K86A	TAGTCCCGCGTGTCTAAGTTGT GC AGGC GC ATGTAGCAGTAATCAAGTAGAG
CrmD58	Mut11	R86A/K86A	CTCTACTTGATTACTGCTACAT GC GCCT GC ACAACCTAGACACGCGGGACTA
CrmD59	Mut12	S90A/S91A	GTGTCTAAGTTGTCGAGGCAAAATGT GC CGC TAATCAAGTAGAGACTAAATCGTGT
CrmD60	Mut12	S90A/S91A	ACACGATTTAGTCTCTACTTGTATTA GC GGC ACATTTGCCCTCGACAACCTAGACAC
CrmD61	Mut13	E116A/F117A/E118A	TGCATCCGGATACTACTGCG CAG CTG CAGGATCAAACGGTTGCAGGC
CrmD62	Mut13	E116A/F117A/E118A	GCCTGCAACCGTTTGATCCT GCA GC TGCGCAGTAGTATCCGGATGCA
CrmD63	Mut14	D146A/I148A	GTATATGGCTACTCATCTAAAGGAG CTG TAG GC ATGTAAAAAGTGTCCGGGTAAATATA
CrmD64	Mut14	D146A/I148A	TATATTACCCGGACACTTTTACAT GC TACAG CT CCTTTAGATGAGTAGCCATATAC
CrmD97	GAG1	K245A	GCAGTGAAGATTAATCTAGAAT CG ATGTAAATCTTGGAAGAGAATCTAGA
CrmD98	GAG1	K245A	TCTAGATTCTCTTCCAGAATTACAT GC GATTCTAGATTAACTTGCACCTGC
CrmD99	GAG2	R250A/R253A	AGATTAATCTAGAAATCAAATGTAATCTTGG AG CAAGATCT GC ACAACCTAACACCCACGACGAAG
CrmD100	GAG2	R250A/R253A	CTTCGTCGTGGGTGTAGTTGT GC AGATTCT GC TCCAGAAATACATTTGATTCTAGATTAATCT
CrmD101	GAG3	K177A	GTAGAAATTAATATGTATCTCTGTTAAC GC GACCTCTTGTAAATTCGAGTATAGGAAG
CrmD102	GAG3	K177A	CTTCCTATACTCGAATTACAAGAGT CG CTTAACAGGATACATATTAATTTCTAC
CrmD103	GAG4	K218A	TCTTTATTTGGAGATTACTATTTCAGTCGTTGAT GC ACTAGCAACTTCAGGTTT
CrmD104	GAG4	K218A	AAACCTGAAGTTGCTAGT GC ATCAACGACTGAATAGTAATCTCCAATAAAGA
CrmD105	CrmD-AAA	D167A/E169A	GTGATCTGTCTTTAACAGCATAG CT GTAG CA ATTAAATATGTATCCTGTTAAACA
CrmD106	CrmD-AAA	D167A/E169A	TTGTTAACAGGATACATATTAAT GT G TACA G CTATGCTGTTAAAGGACAGATCAC
CrmD107	CrmD-AAA	D322A	GATCATATTCACCAAAAT G CTTGTGAAAGAGATGCCTCG
CrmD108	CrmD-AAA	D322A	CGAGGCATCTCTTTCACAA G CATTTGGTGGAATATGATC

3.5 Generación de baculovirus recombinantes

Los baculovirus recombinantes se generaron utilizando el sistema de expresión Bac-to-Bac (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, los genes clonados en el vector pFastBac1 se pueden integrar en bácmidos del genoma del baculovirus bajo la actividad del promotor de la polihedrina mediante la transformación de células DH10bac competentes tras un proceso de transposición. El DNA de los bácmidos recombinantes así obtenidos, se purificó y se transfectó con *cellfectine* (Invitrogen) en células de insecto Sf9 siguiendo las instrucciones del fabricante. Los baculovirus recombinantes se recogieron a las 72 h

post-transfección de los sobrenadantes de las células transfectadas. Estos virus se denominaron P₀ (pase 0) y se guardaron a 4°C y en oscuridad. Posteriormente, estos P₀ se titularon y se amplificaron en un solo paso mediante la infección de células Sf9 a muy baja multiplicidad de infección (moi = 0,01-0,05 ufp/cel) con el fin de generar un stock de baculovirus recombinante de alto título (superior a 5 x 10⁷ ufp/ml) para la expresión de proteína recombinante.

La titulación de los *stocks* se realizó tanto por plaqueo como por inmunofluorescencia. El título obtenido por ambas técnicas fue comparable, así, se pudo equiparar ufp/ml a unidades de fluorescencia (UF)/ml. Para el plaqueo del virus se infectaron pocillos de placas M6 con 2 x 10⁶ células Sf9 por pocillo con diluciones seriadas del *stock*. Tras dos h de adsorción se añadieron 3 ml/pocillo de agarosa *low melting* (Flowgen Bioscience) al 1% en medio TC100 suplementado con 10% FCS. Tras incubar durante 7 días a 27°C, se añadió 1 ml/pocillo de rojo neutro (Sigma) diluido 10 veces con TC100 y 24 h después se contaron las placas.

Para la titulación por inmunofluorescencia se sembraron 1,5 x 10⁶ células por pocillo de M6 en los que se colocaron previamente cinco cubreobjetos por pocillo. Se hicieron diluciones seriadas del *stock* con medio TC100 suplementado con 1% FCS en pocillos de M24 a un volumen final de 350 µl. Se transfirieron los cristales con las células a los pocillos con el virus y se incubó la placa a 27°C. A las 24 h postinfección se lavaron los cristales con PBS-completo (tampón PBS con 0,5 mM MgCl₂ y 0,9 mM CaCl₂, para evitar que las células se levanten) y se fijaron en metanol:acetona (1:1, v/v) a -20°C durante 10 min. Tras rehidratar las muestras, se bloquearon con PBS suplementado con 20% FCS y se incubaron en cámara húmeda con 50 µl del anticuerpo monoclonal anti-V5 (Invitrogen) diluido 1:400 en PBS suplementado con 5% FCS a 37°C durante 1 h. En esas mismas condiciones se incubaron los cristales con 50 µl del anticuerpo anti-mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen) 1:400 en PBS suplementado con 5% FCS. Finalmente, se montaron en cubres y se contaron las células fluorescentes verdes que expresan proteína recombinante mediante microscopía de fluorescencia. En el caso de no contar todas las células fluorescentes de cada preparación, se contaron las células verdes presentes en 10 campos a un aumento 40x, se calculó la media y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\left[\frac{UF}{ml}\right] = \frac{\bar{n} \times 256 \times 10^x}{0,35ml}$$

Donde \bar{n} es la media de las células contadas en los 10 campos, 256 es el número total de campos a un aumento de 40X, 10^x es el factor de dilución y 0,35ml es el volumen final en el que se llevó a cabo la infección. El resultado se expresó en unidades UF/ml.

3.6 Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Se infectaron 10⁸ células de insecto Hi5 a alta moi (moi = 2-5 ufp/cel) con los baculovirus recombinantes correspondientes. A las 72 h postinfección se recogieron los sobrenadantes de la infección (100 ml) y se clarificaron mediante dos centrifugaciones sucesivas durante 5 min a 1.200 y 40 min a 6000 rpm, respectivamente. Posteriormente, se concentraron utilizando el sistema *Stirred Ultrafiltration Cell* 8200 (Amicon) hasta obtener un volumen final de 2,5 ml empleando membranas YM (Millipore) de un tamaño de diámetro de poro para un peso molecular límite (MWCO) de 10.000 Da. Los sobrenadantes así concentrados, se filtraron con filtros de 0,22 µm y se dializaron en “tampón de unión” (50 mM fosfato sódico (pH 7,4), 300 mM NaCl, 10 mM imidazol) empleando columnas de gel filtración PD10 (Amersham Biosciences).

La proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel (resina Níquel-NTA, Qiagen). Para ello, los sobrenadantes concentrados y dializados se incubaron en “tampón de unión” durante 1 h a 4°C con 0,5 ml de resina por cada 100 ml de sobrenadante inicial. A continuación, la resina se montó en columna (Poly-Prep, Bio-Rad) y se lavó con 40 ml de “tampón de lavado” (50 mM fosfato sódico (pH 7,4), 300 mM NaCl, 20 mM imidazol) para eliminar proteínas unidas inespecíficamente. Tras ello, se procedió a eluir la proteína de interés mediante “tampón de elución” con concentraciones crecientes de imidazol (60, 100 y 250 mM) en 50 mM fosfato sódico (pH 7,4), 300 mM NaCl. La proteína se recogió en fracciones de 0,5 ml cada

una y se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y tinción con azul de Coomassie. Para el SDS-PAGE, se prepararon geles de poliacrilamida con dos zonas diferenciadas. Una primer gel concentrador al 5% de acrilamida (30% *Acrylamide/Bis Solution*, BioRad), en 1 M de Tris-HCl pH 6,8 y 0,1% SDS (Sigma) y un gel separador al 12% de acrilamida en 1,5 M de Tris-HCl pH 8,8 y 0,1% SDS. Los geles se polimerizaron añadiendo persulfato de amonio (APS, BioRad) y reactivo TEMED (BioRad), a una relación 1:100 y 1:1000 del volumen total respectivamente. Seguidamente, las muestras proteicas se disociaron hirviendo las muestras durante 5 min en tampón de carga 1X (0,62 mM Tris pH6,8, 2% SDS, 10% (v/v) glicerol, 0,4% (m/v) de azul de bromofenol y 5% (v/v) de β -mercaptoetanol). Junto con las muestras, se corrió en los geles un pocillo con marcadores de peso molecular preteñidos (*Precision Plus Dual Color*, BioRad) o de amplio rango (BioRad) dependiendo de si el objetivo final era una inmunoelectrotransferencia (*Western Blot*) o tinción de Coomassie, respectivamente. La electroforesis se desarrolló en tampón LAEMMLI 1X (25 mM Tris, 250 mM glicina y 0,001% SDS).

Posteriormente, se juntaron las fracciones con mayor grado de pureza y cantidad de proteína, se concentraron y se dializaron en PBS utilizando micro columnas Vivaspín 500 (Sartorius) con un MWCO de 10.000 Da. Finalmente, la concentración exacta de los *stocks* de proteína obtenidos se determinó mediante BCA (BCA protein assay kit, Pierce) y densitometría respecto a sendas calibraciones con BSA (Sigma). Normalmente, los *stocks* de proteína se prepararon a una concentración final 1 mg/ml, se alicuotaron y se guardaron congelados a -20°C por un tiempo máximo de 6 meses.

Para los experimentos descritos en este trabajo, se introdujeron como control, otras proteínas recombinantes purificadas en el laboratorio siguiendo un protocolo similar al descrito anteriormente: B18 (Fernandez de Marco y cols., 2010), A41 (Ruiz-Arguello y cols., 2008), 35K (Ruiz-Arguello y cols., 2008) y hTNFR2Fc (purificada por Carolina Sánchez).

3.7 Ensayos de interacción proteína-proteína

Para evaluar el potencial de unión de citoquinas de las proteínas recombinantes purificadas se utilizaron principalmente dos técnicas: Resonancia de los plasmones de superficie y electroforesis con geles nativos.

3.7.1 Resonancia de los plasmones de superficie (SPR)

En esta técnica, la proteína a analizar, o ligando, se acopla covalentemente a un *chip* de matriz de carboximetildextrano. Posteriormente, los analitos, potenciales ligandos de la proteína, se inyectan sobre el *chip* diluidos en un tampón HEPES durante un tiempo concreto. En caso de unión, la variación de masa producida en la superficie del *chip* produce un cambio en la reflexión de un láser incidente lo que se refleja en un incremento de señal (unidad de resonancia [RU]) en el sensorgrama. Tras este tiempo de asociación, el paso de un tampón de lavado sobre el *chip* produce la disociación de los analitos de baja afinidad y, consecuentemente, un descenso en la señal del sensorgrama. Para llevar la señal a los niveles basales y preparar el *chip* para la unión de un nuevo analito, se inyecta sobre el *chip* una solución de regeneración para disociar las moléculas del último analito que aún permanecían unidas al ligando (Figura 10).

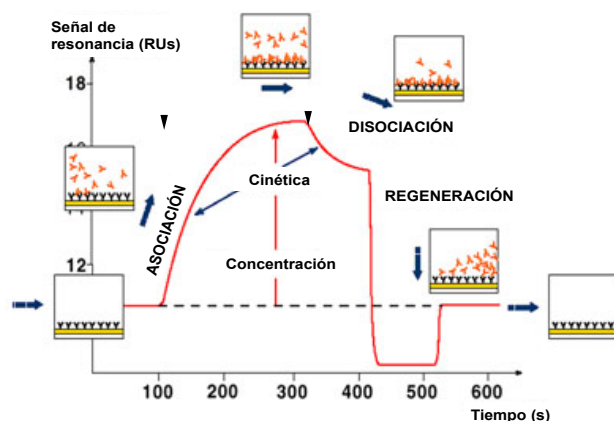


Figura 10. Modelo de sensorgrama en un experimento de SPR. Tras la inyección del analito y ante una unión positiva, se da un aumento en la señal durante el tiempo de asociación. Posteriormente, al parar la inyección, sucede una bajada de la señal debido a la disociación del *chip* del analito. La regeneración de la superficie devuelve la señal a su estado inicial. Los triángulos invertidos indican el inicio y el fin de la inyección.

La caracterización de la especificidad de unión y la afinidad de las interacciones de cada una de las proteínas recombinantes con sus ligandos se llevó a cabo mediante SPR utilizando un Biacore X (GE Healthcare) disponible en el laboratorio. Para los experimentos de unión, se acoplaron covalentemente a *chips* CM4 (Biacore, GE Healthcare) entre 1.000 y 3.000 unidades de resonancia (RUs) de las proteínas purificadas en una de las celdas del *chip*, la otra celda se utilizó como control de unión inespecífica. Las citoquinas recombinantes humanas y murinas se inyectaron a una concentración de 100 nM en tampón HBS-EP (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% (v/v), surfactante P20, pH 7,4), a un flujo de 10 µl/min durante 3 min. Se monitorizaron tanto la asociación como la disociación. Después de cada inyección, la superficie del *chip* se regeneró con 10 mM glicina-HCl, pH 2,0 durante 1 min.

Para la determinación de las afinidades, las proteínas recombinantes purificadas se acoplaron covalentemente mediante aminas a baja densidad (500 RUs) a *chips* CM4 en una de las dos celdas del *chip*, la otra celda se utilizó como control de unión inespecífica. Se comprobó que los *chips* tenían una capacidad de unión máxima menor o igual a 200 RUs y se inyectaron distintas concentraciones de los ligandos (TNFSFLs y CKs) en tampón HBS-EP a un flujo de 30 µl/min durante 2 min y se siguió la disociación durante 5 min. Después de cada inyección, la superficie del *chip* se regeneró inyectando 10 mM glicina-HCl pH 2,0 durante 1 min. En todos los casos se restó la respuesta media de una inyección de tampón HBS-EP para eliminar los posibles artefactos del sistema. Los sensorgramas obtenidos se analizaron globalmente mediante el programa informático Biaevaluation 3.2 (GE Healthcare), normalizándolos y ajustándolos al modelo de unión 1:1 de Langmuir.

Para los ensayos de competición, previamente a la inyección, el analito se incubó en hielo durante 15 min con el posible competidor a la relación molar indicada en cada caso.

3.7.2 Geles Nativos

Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes, se observó la formación de complejos de gran tamaño, al incubar la proteína recombinante con sus posibles ligandos. Se incubó 1 µg de la proteína purificada de baculovirus con TNFα y/o CKs a 4°C durante 30 min en un volumen final de 6 µl. Para estos experimentos se utilizó un tampón PBS sin BSA para resuspender las citoquinas. Como sistema de electroforesis, se utilizó el sistema PhastSystem de GE Healthcare y geles homogéneos prefabricados al 12,5% de poliacrilamida (*PhastGel homogeneous 12.5*, GE Healthcare) acondicionados con *Native Buffer Strips* (GE Healthcare) (Katcher y cols., 1992). Se cargaron 4 µl por pocillo de cada muestra y tras la electroforesis, realizada según las recomendaciones del fabricante, se procedió a teñir el gel con azul de Coomassie.

3.8 Ensayos de actividad *in vitro* con proteína recombinante

Para confirmar *in vitro* las uniones detectadas para las proteínas recombinantes expresadas en baculovirus y purificadas, se llevaron a cabo diversos experimentos que se pusieron a punto para abarcar todas las posibles características inmunomoduladoras de las proteínas caracterizadas en esta tesis.

3.8.1 Ensayos de citotoxicidad con TNFSFLs solubles

Para valorar la actividad *in vitro* de los vTNFRs y las distintas construcciones de CrmD, se llevaron a cabo experimentos de citotoxicidad en células L929, una línea de fibroblastos de ratón, siguiendo un protocolo puesto a punto en el laboratorio (Alejo y cols., 2006). Para ello, se incubaron las distintas citoquinas citotóxicas, a diferentes concentraciones, en ausencia o presencia de cantidades crecientes de proteína recombinante. Tras 1 h de incubación a 37°C en DMEM suplementado con 2% FBS, se añadió la mezcla sobre células L929 sembradas el día anterior en placas de 96 pocillos (M96) a 10.000 células/pocillo. Para acelerar el efecto citotóxico de la citoquina empleada en cada caso, se añadió a las células el inhibidor de la transcripción, actinomicina D (Sigma), a una concentración final de 4 µg/ml.

Tras 18 h de incubación, se midió la viabilidad celular añadiendo 20 μ l por pocillo de *Cell Titter AQueous One Solution* (Promega) y determinando la absorbancia a 492 nm en un lector de placas Sunrise (Tecan). El porcentaje de la viabilidad celular se representó como el cociente entre la absorbancia de las muestras con proteína recombinante y citoquina (muestra problema) y la de los pocillos sin citoquina (viabilidad máxima). Previamente, se sustrajo de todos los datos el valor de absorbancia tomado en ausencia de protección. (pocillos que sólo contenían citoquina, viabilidad mínima)

3.8.2 Ensayo de citotoxicidad con tmTNF α

Para comprobar si CrmD, sus mutantes puntuales y los otros vTNFRs eran capaces de interferir con la función como ligando del tmTNF α , se realizaron experimentos de citotoxicidad utilizando células RAW264.7 como células efectoras y células L929 como diana, adaptando un protocolo descrito por Zheng y cols. (Zheng y cols., 2009). Las células RAW264.7 se estimularon con 500 ng/ml de lipopolisacárido (LPS) derivado de la cepa de *Escherichia Coli* 026:B6 (Sigma), lo cual indujo la expresión de tmTNF α (Yoon y cols., 2007). A las 6 h, se recogieron las células y, tras lavarlas con PBS para retirar el sTNF α , se procedió a su fijación con paraformaldehído (PFA) al 1% durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron a $0,5 \times 10^6$ células/ml en DMEM suplementado con 2% de FCS. Estas células fijadas se incubaron con concentraciones crecientes de CrmD y otras proteínas recombinantes durante 1 h a RT en agitación rotatoria. Tras este tiempo, las células RAW264.7 (efector) se añadieron sobre células L929 (diana) sembradas el día anterior en placas M96 a 10.000 células/pocillo, a una relación efector:diana de 5:1 y en un volumen final de 100 μ l.

Al igual que en los ensayos de citotoxicidad con sTNF α , se añadió sobre las células actinomicina D a 4 μ g/ml para favorecer el efecto del tmTNF α . Después de 18 h de incubación a 37° C, se calculó nuevamente la viabilidad celular con 20 μ l/pocillo de *Cell Titter AQueous One Solution* (Promega) y midiendo la absorbancia a 492 nm. El porcentaje de viabilidad se expresó como el cociente de absorbancias entre las muestras problema y los pocillos en los que no se añadieron células RAW 264.7 (viabilidad máxima). El valor de absorbancia de la supervivencia mínima (muestras sin proteína recombinante) se restó de todos los datos previamente.

3.8.3 Ensayos de señalización reversa mediada por tmTNF α

Se incubaron macrófagos de ratón, RAW 264.7, durante 30 min con cantidades crecientes de proteína recombinante en 50 μ l de DMEM suplementado con 2,5% de FCS. Tras ese tiempo, se dieron 3 lavados con medio fresco, para después incubar las células durante dos h más en 100 μ l de DMEM suplementado con 2,5% FCS. Se recogieron los sobrenadantes y se analizó por triplicado, la presencia de sTNF α de ratón mediante el kit de ELISA, *mtNF α Ready Set Go* (EBioScience) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.8.4 Ensayos de quimiotaxis

Con el objetivo de evaluar la capacidad anti-CK de CrmD y otras proteínas recombinantes, se realizaron experimentos de inhibición de la migración inducida por CKs en *transwell* (Zaballos y cols., 1999).

Se evaluaron varias CKs distintas y para cada caso se utilizaron células que, por expresar el receptor correspondiente, eran capaces de migrar hacia una CK concreta. Así, se tomaron células MOLT4 para la migración con mCCL25 (70 nM), células MonoMac1 con mCXCL12 β (20 nM), o A20 con mCCL27 (125 nM). Para la migración inducida por mCXCL13 (100 nM) se extrajeron esplenocitos de ratones BALB/c. Para ello, bazo extraído de ratones se disgregaron sobre una malla de 70 μ m de poro utilizando coladores de células (BD Bioscience). Se lavaron las mallas con medio RPMI fresco sin FCS y se centrifugaron las células a 1.500 rpm durante 5 min. Para lisar los eritrocitos, se realizó un choque hipotónico con agua estéril durante 10 segundos. Se detuvo la lisis añadiendo 0,5 ml de NaCl 0,1M y se lavaron las células con medio RPMI suplementado con 0,1% de FCS, medio en el que se mantuvieron las células durante 4 h antes del experimento.

El día del ensayo con las líneas celulares A20, MOLT4 y MonoMac 1, se recogieron las células en crecimiento exponencial y, tras lavarlas con PBS, se resuspendieron a 10×10^6 células/ml en RPMI suplementado con 0,1% de FCS. Para estos ensayos se utilizaron placas M96 en *transwell* (Neuroprobe). En los pocillos inferiores se incubó la CK en ausencia o presencia de cantidades crecientes de proteína purificada en RPMI suplementado con 0,1% FCS, a 37°C durante 30 min. Se colocó la membrana sobre la placa y se repartieron 25 µl de la suspensión de células en cada uno de los compartimentos superiores. Tras 3-4 h de migración a 37 °C, se lavaron las células restantes de los compartimentos superiores con PBS y se centrifugaron las placas dos min a 1.000 rpm antes de retirar la membrana. Se cuantificó el número de células que atravesaron la membrana hacia los pocillos inferiores donde se encontraba la CK añadiendo 5 µl/pocillo de *Cell Titer Aqueous One Solution* (Promega) y midiendo la absorbancia a 492 nm. Los resultados se representaron como el porcentaje en relación a la migración en ausencia de proteína recombinante. Los datos se normalizaron previamente con la absorbancia en ausencia de CK.

3.9 Ensayos de unión a GAGs

Se han utilizado cuatro aproximaciones distintas para analizar la unión de proteína recombinante a GAGs: SPR, citometría, microscopía de fluorescencia y precipitación con heparina.

3.9.1 SPR

Se generó un *chip* acoplado con heparina biotinilada (Calbiochem). Se acoplaron 2000 RUs de estreptavidina (Sigma), diluida en acetato pH 4,0 a 0,2 mg/ml, en un *chip* CM4 mediante el sistema de inmovilización covalente por aminas en las dos celdas del chip. Se bloquearon los sitios activos de la matriz con etanolamina 1 M pH 8,5 y seguidamente, se pasaron 5 µg/ml de heparina biotinilada diluida en HBS-EP con 300 mM de NaCl por una de las dos celdas. La otra celda, en la que sólo se acopló estreptavidina, se utilizó como control de uniones inespecíficas. De esta manera, se consiguieron capturar 50 RUs de heparina de forma prácticamente irreversible debido a la altísima afinidad de la interacción estreptavidina-biotina ($K_D \sim 10^{-14}$ M).

Para analizar la afinidad por la heparina, se pasaron distintas concentraciones de proteína recombinante purificada en tampón HBS-EP, regenerando posteriormente el *chip* con inyecciones de 1 min con 2 M $MgCl_2$. Los sensorgramas se normalizaron y ajustaron a un modelo de Langmuir 1:1 para determinar las constantes de afinidad mediante el paquete informático Bioevaluation 3.2.

Se evaluó la especificidad de la interacción CrmD-heparina mediante un ensayo de competición con GAGs solubles, heparina, heparan-sulfato (HS) y condroitin sulfato A (CSA) y B (CSB) (Sigma). Para ello, se preincubó la proteína CrmD (30 nM), diluida en HBS-EP, con cantidades crecientes de los distintos GAGs solubles, en hielo durante 15 min. La mezcla se pasó por el *chip* de heparina y se recogió la respuesta en el equilibrio para cada muestra. Se analizó el porcentaje del aumento de señal en cada muestra respecto al valor obtenido para la proteína CrmD en ausencia de GAGs solubles.

3.9.2 Citometría de flujo

Se analizó la unión de proteína recombinante a la superficie de las líneas celulares, L929, MOLT4 y mutantes de células CHO para la expresión de GAGs en superficie, CHO-K1, CHO-618 y CHO-745. Las células CHO-K1 tienen una expresión normal de GAGs en superficie, sin embargo, las células CHO-745 no sintetizan HS ni CS y las CHO-618 carecen absolutamente de cualquier tipo de GAGs en superficie (Zhang y cols., 2006b). Se incubaron 300.000 células con 200 nM de proteína en 50 µl de PBS-*staining* (PBS suplementado con 1% FCS y 1% BSA) durante 30 min en hielo. Para detectar las proteínas en la superficie, se incubó durante 20 min con una dilución 1:400 en PBS-*staining* del anticuerpo de ratón monoclonal anti-PentaHis (Qiagen) seguida del marcaje con un anticuerpo secundario anti-mouse conjugado con Alexa488 (Invitrogen) a 1:500 en PBS-*staining* en oscuridad durante 20 min. Se recogieron 10.000 eventos en un citómetro FACSCantoII (BD Bioscience) y se analizaron en el programa informático FlowJo 7.2.2 (Treestar).

3.9.3 Inmunofluorescencia

Se utilizaron células CHO y células L929 sembradas en confluencia en cubreobjetos previamente lavados con etanol y expuestos a luz UV. Las células se incubaron con 150 μ l de 200 nM de la proteína recombinante en PBS-*staining* durante 30 min a 4°C y después se fijaron con 4% de PFA en PBS a temperatura ambiente (RT). Se lavaron los cubres tres veces y se procedió al bloqueo de los sitios inespecíficos incubando con PBS suplementado con 5% FCS durante 15 min a RT. Para detectar la proteína en superficie se utilizó una dilución 1:600 en PBS suplementado con 1% FCS del anticuerpo monoclonal de ratón anti-V5 (Invitrogen) seguido del marcaje con un anticuerpo secundario anti-mouse conjugado con Alexa488 (Invitrogen) diluido 1:900 en PBS suplementado con 1% FCS. Para el montaje, se pasaron los cubres secuencialmente por PBS, agua y etanol y se colocaron sobre los portaobjetos con una gota de medio de montaje Prolong (Invitrogen). Las muestras se observaron y analizaron mediante un microscopio de fluorescencia Axioskop2 plus (Zeiss) acoplado a una cámara Coolsnap FX (Roper Scientific) controlada por el software MetaVue 5.07 (Molecular Devices).

3.9.4 Precipitación con resina de heparina

Las proteínas recombinantes utilizadas para este ensayo se incubaron en presencia o ausencia de TNF α , durante 1 h a RT en agitación rotatoria con 20 μ l de una resina de heparina acoplada a agarosa (50% v/v) en 400 μ l de tampón de unión (PBS suplementado con 0,2% FCS). Tras ese tiempo se recuperaron las esferas de agarosa centrifugando 1 min a 13.000 rpm. Se decantaron los sobrenadantes y las esferas se lavaron con tampón de unión tres veces. La proteína unida se eluyó de la resina añadiendo 25 μ l de tampón de carga para SDS-PAGE e hirviendo la muestra durante 5 min. Las proteínas se detectaron mediante inmunoelectrotransferencia (Western blot) con los anticuerpos anti-PentaHis (1:2.000) (Qiagen) y anti-TNF α (1:1.000) (R&D Systems) y los secundarios conjugados con peroxidasa anti-ratón (1:5.000) (GE Healthcare) y anti-cabra (1:1.000) (R&D Systems), respectivamente.

3.10 Generación de ECTV recombinantes

Para obtener ECTV recombinantes, se utilizó un método de selección dominante transitoria con puromicina puesto a punto en nuestro laboratorio (Alejo y cols., 2009) (Figura 11). Este método permite la introducción o delección de genes de un virus diana sin alterar su genoma y sin añadir epítomos artefactuales.

El virus diana fue el virus de delección de CrmD (ECTV Δ CrmD), sobre el que se introdujo una forma mutada del gen de CrmD (Mut4) para generar el recombinante que se denominó ECTV RevSECRET. Se infectaron 25 x 10⁴ células BS-C-1 a baja moi (moi=0,01-0,1 ufp/ml) con ECTV Δ CrmD y, tras dos h de adsorción, se transfectaron con el vector pSP21 que lleva la mutación N77F (Mut4) (Ver sección 3.4 *Clonajes*). Para esta mutación se utilizó la misma pareja de oligonucleótidos que se utilizó para generar el gen de la proteína Mut4 en pFastBac1 (CrmD43 y CrmD44) (Tabla 5). El plásmido pMS37 contiene el gen CrmD, junto con sus regiones genómicas flanqueantes 5' y 3'. Además, en este plásmido se incluyen, el gen de la proteína fluorescente GFP, expresada bajo un promotor sintético tardío y el gen de la N-acetil transferasa de resistencia a la puromicina (PAC) bajo una secuencia IRES. Tras este proceso de infección-transfección (Figura 11A (1)), el gen mutado de CrmD junto a GFP y PAC se introdujo en el sitio original del gen en el genoma de ECTV Δ CrmD mediante recombinación homóloga (Figura 11A (2)). Para enriquecer este virus en la muestra se realizaron varios pases sucesivos en medio selectivo con 10 μ g/ml de puromicina (Figura 11B). Se recogieron las células 3-4 días postinfección y se sometieron a tres pasos de congelación-descongelación para liberar el virus. Después, se dieron hasta cuatro pases de selección en presencia de puromicina para enriquecer la muestra en el recombinante de interés. En cada pase se infectaron 25 x 10⁴ células BS-C-1 con el virus y a las 4 h se añadió puromicina (SIGMA) a 10 μ g/ml. 48 h después se recogieron las células resuspendidas en 0,5 ml de medio DMEM suplementado con 2,5% de FCS.

Posteriormente, la muestra obtenida tras la última ronda de selección se plaqueó en ausencia de puromicina. Para ello se infectaron células BS-C-1 preconfluentes en pocillos de placas M6, con 10 μ l y 1 μ l de la muestra viral y tras 2 h de adsorción se añadió medio de plaqueo CMC (carboximetil celulosa, CMC). CMC es un medio semisólido consistente en la mezcla 1:1 de CMC (Sigma) de dos viscosidades, alta (1.500-3.000 cps) y baja (50-200 cps). A los tres días postinfección se picaron las placas de lisis verdes (Figura 11B) resultado de la infección por el virus recombinante transitorio que ha incorporado en su genoma el vector pSP21 completo y expresa la proteína fluorescente GFP (Figura 11A (2)).

En sucesivas rondas de plaqueo, el virus se resuelve perdiendo los genes de PAC y GFP dando lugar a placas de lisis blancas (Figura 11B) correspondientes al virus original o el nuevo virus recombinante (Figura 11A (3)). Para diferenciarlos, se realizaron PCRs con oligonucleótidos específicos. Una vez obtenido el recombinante ECTV RevSECRET, se purificó por aislamiento de placa de lisis mediante tres rondas adicionales de plaqueo.

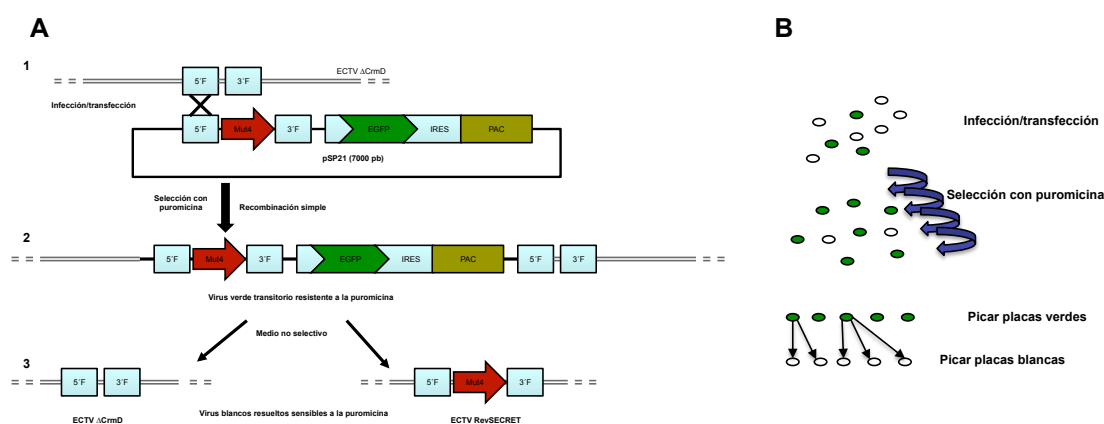


Figura 11. Método de selección dominante transitoria para la obtención de ECTVs recombinantes. A) Representación esquemática de los estados de recombinación del virus durante el protocolo: 1. Infección-transfección; 2. Virus fluorescente verde resistente a la puromicina; 3. Virus blanco (no fluorescente) sensible a la puromicina. B) Resumen de los pasos secuenciales para la obtención de ECTVs recombinantes: Infección-transfección, rondas de selección con puromicina, plaqueo para aislar (picar) placas de lisis fluorescentes verdes y plaqueo para picar placas de lisis blancas o no fluorescentes

3.10.1 Amplificación y semipurificación de ECTV mediante colchón de sacarosa

Tras obtener una placa pura para el ECTV recombinante buscado, se infectó un pocillo de células BS-C-1 con 20 μ l de la placa de lisis. Al tiempo de observar efecto citopático completo, se recogieron las células en 500 μ l de DMEM suplementado con 2,5% FCS y se guardó a -80°C como *master stock*. Este stock se amplificó a un *stock* P₁ infectando una placa p150 de células BS-C-1 con 1 μ l. El *stock* P₁ se utilizó para generar los stocks purificados y de trabajo.

El virus se purificó en colchón de sacarosa al 36%. Brevemente, se infectaron cuatro placas p150 de células BS-C-1 a baja moi (moi = 0,1-0,01) y se esperó hasta observar efecto citopático total, típicamente 4-7 días postinfección. Se recogieron las células mediante rascado y, tras un lavado en PBS, se resuspendieron en 1 ml de Tris 10 mM pH 9,0, donde se incubaron durante 10 min en hielo. Tras ese tiempo, se dieron 25 pases en jeringuilla por aguja de 25G para romper las células y liberar el virus. Los restos celulares se precipitaron mediante centrifugación a 2.500 rpm durante 5 min y se guardó el sobrenadante que contenía el virus, para el colchón de sacarosa. Este paso se repitió una vez más con el precipitado obtenido.

Después y en tubos de ultracentrífuga, se prepararon 33 ml de colchón de sacarosa al 36% en Tris 10mM pH 9,0 y filtrado por 0,22 μ m. Se colocó la muestra en la parte superior del colchón cuidadosamente y se centrifugó en un rotor SW28 de la ultracentrífuga Optima L100XP (Beckman Coulter) durante 1 h a 4°C y 20.000 rpm. Finalmente, se decantó el colchón y se resuspendió el precipitado en 500 μ l de Tris 10 mM pH 9,0. Antes de su utilización, los stocks virales se titularon mediante plaqueo en BS-C-1. Para ello, se infectaron con distintas diluciones del virus (rango de diluciones seriadas entre 10⁻⁵ y 10⁻⁸) 2,5 x 10⁵ células sembradas en

pocillos de placas M6. Tras 1 h de adsorción en 1 ml, se retiró el inóculo y se añadieron 2 ml/pocillo de medio semisólido CMC. A los 6-7 días de la infección, se fijaron las células durante 30 min con PFA al 2% y se tiñeron con cristal violeta al 2% durante otros 30 min. Se retiró la tinción con agua y se contaron las placas de lisis generadas en cada dilución y se estimó el título en ufp/ml.

3.11 Ensayos con sobrenadantes de células infectadas con ECTV

Para analizar la función de los vTNFRs expresados por los distintos ECTV recombinantes generados, se trabajó con los sobrenadantes de células infectadas con los distintos virus. Se realizaron experimentos de cuantificación y actividad con los que poder comparar la cantidad de proteína expresada en el sobrenadante por cada virus.

3.11.1 Infección de células BS-C-1 con ECTV

Se infectaron células BS-C-1 sembradas en pocillos de placas M6 el día anterior a una densidad de 120.000 células por pocillo. Las células se infectaron a una moi de 5 ufp/cel en 2 ml de medio DMEM suplementado con 2% de FCS. A las 24 h, se recogieron los sobrenadantes y se procedió a su inactivación. Para ello, los sobrenadantes se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente con psoraleno (Sigma) a una concentración final de 2 µg/ml. A continuación, se irradiaron los sobrenadantes con luz UV de larga longitud de onda (365 nm) durante 10 min en un *crosslinker* (Uvitec) (Tsung y cols., 1996).

Tras la inactivación, los sobrenadantes se concentraron 10 veces empleando tubos Vivaspin 500 (Sartorius) con un tamaño de poro de 10.000 MWCO. Estos sobrenadantes así concentrados, se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

3.11.2 Ensayos de cuantificación de proteína: ELISA y Western Blot

Para poder comparar dos virus recombinantes en un ensayo *in vivo*, es importante confirmar previamente que ambos virus expresan cantidades similares de la proteína en estudio. Al no disponer de un ensayo puesto a punto para determinar la capacidad de inhibir la función de las CKs por el ECTV recombinante RevSECRET, se recurrió a ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y de inmunoelectrotransferencia (*Western Blot*).

Para el ensayo de ELISA se utilizó como anticuerpo de captura un anticuerpo monoclonal anti-SECRET que se produjo en colaboración con el laboratorio del Dr. Daved Fremont (Washington University, Saint Louis, Missouri (EE.UU.). Se tapizaron placas de 96 pocillos (Costar Maxisorb) con 100 µl de anti-SECRET (10 µg/ml) en PBS y se incubaron a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, para evitar las uniones inespecíficas, se bloqueó con leche al 5% en PBS con 0,05% de Tween20 durante 1 h a RT. Se incubaron 50 µl de los distintos virus, por triplicado, durante 2 h a RT. Finalmente, se detectó la proteína mediante un anticuerpo policlonal de conejo anti-CrmD, generado en nuestro laboratorio, a una dilución 1:5.000 durante 1 h a RT, seguido de una incubación de 30 min a RT con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa (GE Healthcare), diluido 1:5.000 en tampón de bloqueo. Para revelar, se utilizaron 100 µl por pocillo del sustrato para la peroxidasa 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB, Sigma). Tras incubar 15 min a RT se detuvo la reacción con 50 µl de H₂SO₄ 0,2 N y se midió la absorbancia a 450nm en un lector de placas Sunrise (Tecan). También se midió la absorbancia a 565nm, que se tomó como longitud de onda de referencia y se sustrajo de la absorbancia a 450 nm de todas las muestras antes del análisis. En el experimento, se incluyó una curva de calibrado para cada proteína de interés, que se realizó con la proteína recombinante correspondiente purificada de baculovirus. Interpolando en estas curvas de calibrado se calculó la concentración y proteína total presente en los sobrenadantes.

Para los ensayos de inmunoelectrotransferencia (*Western Blot*), 10 µl de cada stock concentrado de los distintos sobrenadantes fueron sometidos a SDS-PAGE. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante transferencia húmeda. Los sitios inespecíficos de la membrana fueron bloqueados con leche en polvo al 3% en PBS-Tween20. Como anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo anti-CrmD diluido 1:2.500 en tampón de bloqueo. Se utilizó el mismo anticuerpo secundario y en las mismas condiciones que en el ELISA y finalmente se reveló en películas Curix RP2 plus (AGFA), utilizando el procesador fotográfico X-OMAT M35 (Kodak) y un sustrato casero consistente en una dilución de 1,25 mM de luminol, 0,225 mM de ácido cumárico y 0,01% de H₂O₂ en 100 mM de Tris-HCL pH 8,5.

3.11.3 Ensayo de citotoxicidad de TNFα

Básicamente, se procedió de manera similar a los ensayos con proteína recombinante, pero fue necesario realizar experimentos previos para poner a punto la técnica con el fin de observar protección significativa del efecto citotóxico, con la cantidad de proteína que se recupera en un sobrenadante de células infectadas con ECTV.

Finalmente, se realizaron los experimentos con 6 pM de mTNFα que se incubaron durante 1 h a 37°C y por triplicado en ausencia o presencia de cantidades crecientes de los distintos sobrenadantes (volúmenes equivalentes a 2, 8 y 16 x 10³ células BS-C-1). Las mezclas, en combinación con 4 µg/ml de actinomicina D (Sigma) se añadieron después sobre 30 x 10³ células L929 sembradas el día anterior en pocillos de placas de 96 pocillos. Como hasta ahora, para calcular la viabilidad, se añadió 20 µl/pocillo de *CellTiter AQueous One Solution* (Promega) que se incubó 1 h a 37°C antes de medir la OD a 492nm. Se restó, de todos los datos, el valor de absorbancia de la viabilidad mínima, procedente de pocillos con mTNFα sin inhibidores y se calculó el cociente de absorbancias entre las muestras y la viabilidad máxima recogida en pocillos sin mTNF. Se incluyó siempre un sobrenadante *mock*, obtenido de células no infectadas, cuyo porcentaje de viabilidad, se restó de la supervivencia obtenida al incubar el mTNFα con los sobrenadantes de los distintos virus.

3.12 Ensayos *in vivo* en ratones infectados con ECTV

Toda la experimentación con animales se llevó a cabo en el Centro de Investigación de Sanidad Animal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (CISA-INIA), donde se dispone de un animalario con nivel de bioseguridad biológica 3 (P3) que garantiza la contención del agente patógeno. El objetivo de estos experimentos fue la comparación de la DL₅₀ de los distintos virus. La DL₅₀ se define como la dosis necesaria para matar al 50% de los animales infectados.

Se infectaron ratones hembras BALB/c (Harlan) de entre 6 y 8 semanas de edad por vía subcutánea en la almohadilla plantar de la pata posterior izquierda. Los animales se alojaron en jaulas de un *rack* ventilado (Tecniplast) que compartimenta y aísla unas jaulas de otras con ventilación individualizada, evitando posibles contaminaciones entre cajas. Cada jaula cuenta con su propio filtro HEPA. Aún con estas medidas, todos los experimentos se acompañaron de al menos una caja con 5 ratones no infectados como centinelas de infecciones cruzadas. Se inocularon grupos de 5 ó 10 ratones con 10 µl de diferentes dosis de virus semipurificado diluido en PBS–BSA 0,1%.

Se siguió la evolución de la enfermedad durante al menos 20 días en los que se tomaron datos individualizados de supervivencia, peso, inflamación de la pata inoculada, lesiones en la piel y síntomas generales. Para evaluar los síntomas, se otorgó a cada animal un factor comprendido entre 0 y 4 atendiendo a observaciones del estado general (**0**: animal sano; **1**: pelo ligeramente erizado y lentitud de movimientos; **2**: pelo muy erizado, caminar ligeramente encorvado y movilidad reducida; **3**: conjuntivitis, debilidad, caminar muy encorvado y pequeñas heridas en la cola; **4**: parálisis de cuartos traseros, movilidad nula, conjuntivitis severa que impide abrir los ojos, gran debilidad y lesiones severas en nariz y cola).

La respuesta inmunológica causada por cada virus se valoró mediante citometría de flujo de órganos linfoides de los animales infectados. A los dos días postinfección se extirparon los ganglios poplíteos que drenan la pata infectada. Para ello, previamente se inocularon los ratones en la almohadilla plantar con 20 μ l de solución azul de tripano 0,4% en PBS (Sigma). Este procedimiento tiñe los ganglios de un color azul que hace más fácil su localización. A continuación, se realizó una incisión en la zona plantar de la tibia para extraer los ganglios con ayuda de unos fórceps para depositarlos en hielo en 1 ml de medio RPMI suplementado con 5% de FCS. Para obtener una suspensión celular de estos ganglios, se machacaron sobre una malla de 70 μ m de poro utilizando filtros de células (BD Bioscience). Se lavaron las mallas con medio fresco y se centrifugaron las células a 1.500 rpm durante 5 min. El total de las células de cada ganglio se sembró en placas M96 de fondo cónico para su marcaje. Las células se marcaron con diluciones en PBS-*staining* de los siguientes anticuerpos conjugados: FITC-DX5 (1:125) (BD Bioscience) PerCP-CD3 (1:125) (BD Bioscience) y PE-CD8 (1:125) (BD Bioscience). Para el marcaje intracelular de granzima B, las células se fijaron-permeabilizaron previamente con una solución de PFA-saponina (4% PFA y 0,2% saponina en tampón HBSS) a RT durante 10 min y se procedió con el marcaje con una dilución 1:100 del anticuerpo APC-Granzima B (R&D Systems) en PBS suplementado con 0,2% de saponina. En cada experimento se incluyeron los controles de isotipo correspondientes. Seguidamente, se pasaron las células por un citómetro FACSCalibur (BD Bioscience) recogiendo al menos 100.000 eventos de cada muestra que se compensaron y analizaron finalmente con el software FlowJo 7.2.2 (Treestar).

Este mismo procedimiento y marcajes se utilizaron para la citometría de los bazo obtenidos 7 días postinfección. Antes de marcar los esplenocitos, se eliminaron los eritrocitos de las muestras mediante choque hipotónica con agua. Para ello, se precipitaron las suspensiones celulares de cada bazo a 1.500 rpm durante 5 min para después resuspender en agua estéril y detener la lisis a los 10 s con 0,5 ml de NaCl 0,1 M. Se añadieron 10 ml de medio RPMI suplementado con 5% de FCS a cada tubo y se prosiguió con los lavados previos al marcaje.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterización molecular de CrmD

Los receptores celulares del TNF, TNFR1 y TNFR2, se caracterizan por presentar en su región extracelular, una repetición de dominios ricos en cisteínas (CRDs) responsables de la interacción con el TNF (Bodmer y cols., 2002). Los poxvirus han copiado esta misma configuración de dominios CRD y han diseñado moléculas capaces de interactuar con el TNF, impidiendo su unión al receptor celular y bloqueando así la actividad biológica de esta citoquina (Cunnion, 1999). Hasta la fecha, se han identificado cuatro vTNFRs en *Orthopoxvirus*, *Cytokine response modifier B* (CrmB), CrmC, CrmD y CrmE. Estos vTNFRs, tal y como se ha detallado en la *Introducción*, son codificados diferencialmente entre los distintos miembros de la familia *Poxviridae* y como se verá en los resultados obtenidos en esta Tesis, presentan diferencias estructurales y funcionales.

CrmD, el TNFR soluble de ECTV, al igual que CrmB de VARV, presenta un dominio C-terminal que está ausente en CrmC y CrmE. En nuestro laboratorio, se describió por primera vez que esta región añadida es en realidad un dominio de unión e inhibición de la actividad de las CKs y se denominó dominio SECRET por *Smallpox Virus Encoded Chemokine Receptor* (Alejo y cols., 2006). Se determinó que los dominios CRD y SECRET eran estructural y funcionalmente independientes, de tal manera que cada uno de ellos por separado, era capaz de desempeñar perfectamente su actividad anti-TNF o anti-CKs, respectivamente. Más aún, los resultados demostraron que CrmD era de vital importancia en la patogénesis de ECTV ya que un virus recombinante que no expresaba la proteína CrmD, presentó una severa atenuación en su virulencia aumentando su DL_{50} en 6 órdenes de magnitud con respecto al virus parental, es decir, desde las 10 ufp por ratón hasta las 10^7 ufp por ratón (Ruiz-Arguello y cols., 2012).

4.1.1 Expresión y purificación de CrmD y sus dominios

Alejo y cols., en el laboratorio, describieron además la existencia de otras proteínas de poxvirus con características de secuencia y actividad similares al dominio SECRET. Estas proteínas se denominaron *SECRET domain-containing protein 1* (SCP1), SCP2 y SCP3 (Alejo y cols., 2006).

Los dos vTNFRs con dominio SECRET, CrmB y CrmD, al igual que los receptores celulares TNFR1 y TNFR2, se describieron como proteínas con cuatro CRDs en el dominio N-terminal (Alejo y cols., 2006; Hu y cols., 1994; Loparev y cols., 1998). El alineamiento de las secuencias de estos vTNFRs con las SCPs, mostró dentro de la secuencia del supuesto CRD4, dos residuos altamente conservados, una fenilalanina (F^{163}) y una asparagina (N^{164}), localizados al inicio de las SCPs (Figura 12A).

Por ello, se decidió generar dos versiones del dominio SECRET de CrmD, las proteínas CrmD163 y CrmD181, con el fin de llevar a cabo un estudio molecular de este dominio. CrmD181 corresponde a la secuencia de un dominio SECRET que comienza inmediatamente después del CRD4, mientras que CrmD163 es una versión más larga que comienza en el residuo F^{163} conservado en todas las SCPs (Figura 12A).

También se expresó una proteína CrmD, equivalente a los tres primeros CRDs del extremo N-terminal (hasta el aminoácido K^{151}). Para evitar confusiones, se hará referencia a esta proteína como CRD-CrmD. Así, las secuencias correspondientes a CrmD, CRD-CrmD, CrmD163 y CrmD181 (Figura 12B), fueron clonadas en el vector pFastBac1 con el fin de generar los baculovirus recombinantes correspondientes que expresaran cada una de las proteínas. Se procedió en todos los casos de manera similar tal y como se detalla en *Materiales y Métodos*.

que contuvieron proteína con mayor grado de pureza se juntaron y se dializaron contra PBS. Finalmente y previo al uso de la proteína en cualquier tipo de experimento, se controló mediante SDS-PAGE que la pureza de los *stocks* fuese de al menos el 90% (Figura 13B) y se cuantificaron mediante BCA y densitometría. Estos *stock* se almacenaron congelados a una concentración cercana a 1 mg/ml.

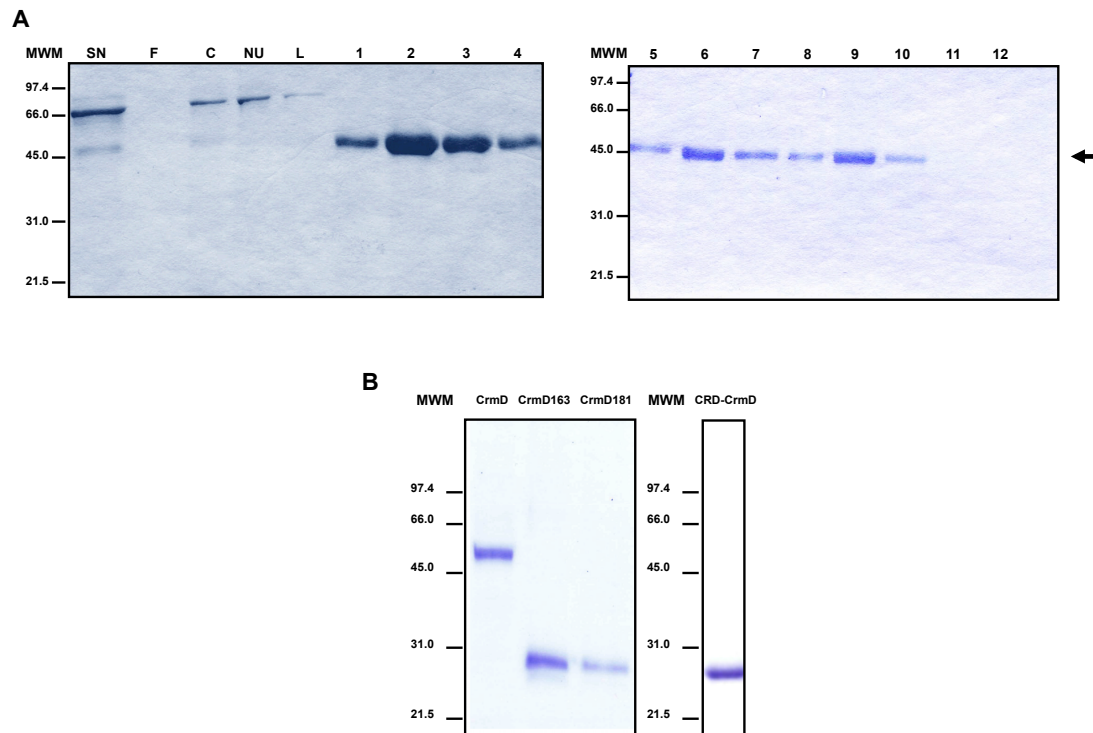


Figura 13. Purificación de CrmD, CRD-CrmD, CrmD163y CrmD181. A) SDS-PAGE seguido de tinción con azul de Coomassie de las fracciones recogidas durante la purificación de CrmD mediante cromatografía de afinidad en resina Ni-NTA. Los sobrenadantes (SN) de células infectadas con el baculovirus recombinante correspondiente fueron concentrados mediante el sistema de Amicon y se recogió el filtrado (F) para controlar posible pérdidas. El concentrado (C) se dializó en "tampón de unión" y se incubó durante 1h con resina Ni-NTA, tiempo tras el cual se descartó la fracción del sobrenadante no unido (NU) y se procedió a lavar (L) la resina con "tampón de lavado". Finalmente y con concentraciones crecientes de imidazol en el "tampón de elución", 60mM (1-4), 100mM (5-8) y 250mM (9-12), se eluyó la proteína de la resina en distintas fracciones. Con una flecha se indica la posición de la banda correspondiente a la proteína CrmD. B) Gel teñido con azul de Coomassie correspondiente a 500ng de los *stocks* de proteína recombinante CrmD, CrmD163, CrmD181 y CRD-CrmD purificados. MWM: marcadores de masa molecular (kDa).

4.1.2 Análisis por SPR de los potenciales ligandos de CrmD

4.1.2.1 Unión de TNFSFLs a CrmD

Loparev y cols. describieron CrmD como una proteína capaz de unir TNF α (TNFSFL2) y linfotóxina-alfa (LT α) (TNFSFL1) (Loparev y cols., 1998). Sin embargo, recientemente se han descrito hasta 19 miembros pertenecientes a la TNFSFL (Bodmer y cols., 2002). Cada una de estas citoquinas ejerce sus funciones biológicas mediante la interacción con un receptor específico. Estos receptores se agrupan dentro de la TNFSFR y guardan similitudes estructurales tanto entre ellos como con los vTNFRs.

Por ello, se postuló que CrmD además de unir LT α y TNF α podría ser capaz de interaccionar con otros TNFSFLs. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de unión mediante SPR analizando 100 nM de cada uno de los TNFSFLs, disponibles comercialmente, tanto humanos como murinos (Tabla 6), sobre un *chip* CM4 acoplado con ~3000 RUs de CrmD recombinante purificado. Se consideró una unión positiva para aquellos analitos que registraron una respuesta superior a 20 RUs al final de la asociación (3 min tras la inyección). Además de la LT α y TNF α murinos, se detectó unión en el caso de los ligando de ratón LT β (TNFSFL3A y 3B), TWEAK (TNFSFL12), APRIL (TNFSFL13) y LIGHT (TNFSFL14) (Tabla 6 y Figura 14). Las formas humanas de estos mismos TNFSFLs se unieron a CrmD a excepción de LIGHT y APRIL (Tabla 6).

Tabla 6. Lista de TNFSFLs probados para la unión a CrmD mediante SPR. Se registró la señal máxima al final de la inyección de 100 nM de cada analito: +: >20RUs; -: <20RUs. Entre paréntesis se indica el número del nombre sistemático de cada citoquina.

	humano	murino
TNFβ/LTα (1)	+	+
TNFα (2)	+	+
LTβ (α1β2) (3A)	+	+
LTβ (α2β1) (3B)	+	+
OX40L (4)	-	-
CD40L (5)	-	-
FasL (6)	-	-
CD27L (7)	-	-
CD30L (8)	-	-
4-1BBL (9)	-	-
TRAIL (10)	-	-
RANKL (11)	-	-
TWEAK (12)	+	+
APRIL (13A)	-	+
BAFF (13B)	-	-
LIGHT (14)	-	+
TL1A/VEGI (15)	-	-

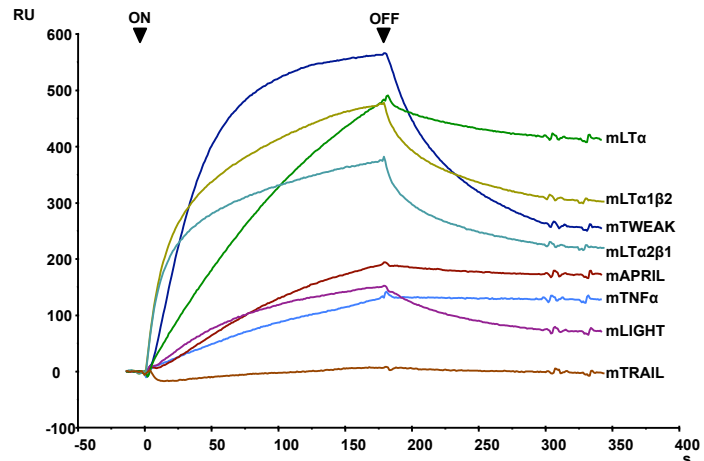


Figura 14. Unión a CrmD de miembros de la mTNFSFLs determinada por SPR. Los diferentes analitos se inyectaron a 10 μ l/min sobre un chip CM4 acoplado con CrmD (~3.000 RUs), a 100nM en HBS-EP, durante 3 min. La disociación se siguió durante 2 min. Con triángulos invertidos, se indica el inicio (on) y fin (off) de la inyección.

4.1.2.2 Unión de CKs a CrmD

El dominio SECRET de CrmB fue caracterizado como un dominio con capacidad de unir con alta afinidad ($K_D \sim 0,3-30$ nM) un pequeño grupo de CKs humanas (hCCL20, hCCL25, hCCL28, hCXCL12 β , hCXCL13, hCXCL14, hXCL1) (Alejo y cols., 2006). Dado el gran parecido entre los dominios SECRET de CrmD y CrmB, se ensayó mediante SPR la unión a CrmD de un grupo de CKs que incluyese los ligandos quimiotácticos de CrmB. CrmD interaccionó con las mismas hCKs que une CrmB (resultados no mostrados). Dado que CrmD es una proteína expresada por un patógeno estrictamente murino, se analizaron también los ligandos de ratón (mCKs). Para tener una idea de la posible afinidad de las distintas CKs, después de obtener los sensorgramas de unión de cada una de ellas (Figura 15A), se elaboró un *ranking* en el que se tuvo en cuenta no sólo cuánto se unía cada CK sino también cómo de rápido se disociaba de CrmD. Para ello, se tomaron los datos de las RUs a los 130 s de la inyección (RUs_{130a}) y las RUs 50 s después del inicio de la disociación (RUs_{50d}). Un cociente RUs_{50d} / RUs_{130a} cercano a 1 equivale a una CK que a penas se disocia de CrmD y por tanto, previsiblemente forma complejos de alta afinidad. Se concluyó que probablemente, el set de mCKs unidas por CrmD con alta afinidad lo conformaban siete (mCCL24, mCCL25, mCCL27, mCXCL11, mCXCL12 β , CXCL13 y mCXCL14) de las 11 mCKs probadas (Figura 15B).

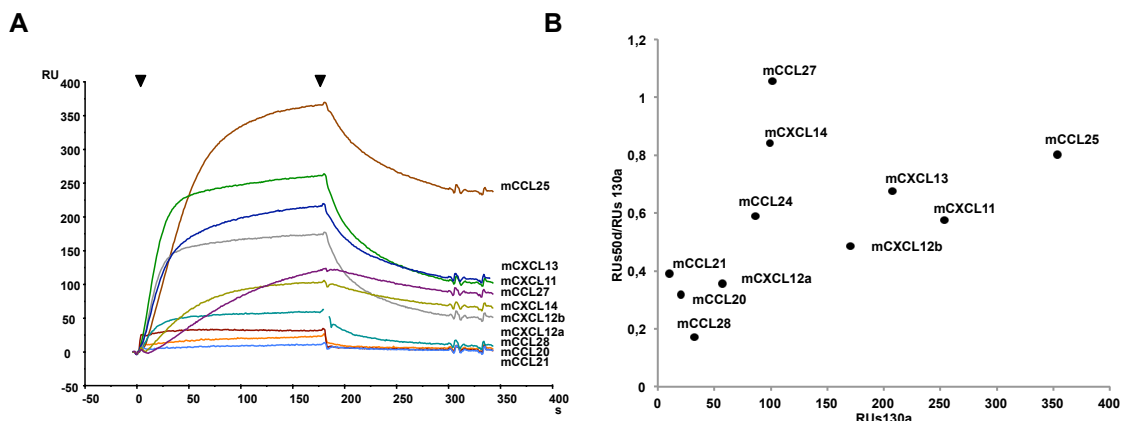


Figura 15. CrmD une un pequeño grupo de mCKs. Se inyectó 100 nM de cada mCK en HBS-EP a 10 μ l/min sobre un chip CM4 acoplado con CrmD. Se permitió la asociación del analito durante 3 min y se siguió su disociación durante 2 min mediante SPR. A) Sensorgramas de la unión a CrmD de las distintas mCKs. Se indica con triángulos invertidos, el inicio y el final de la inyección. B) *Ranking* de unión a CrmD de todas las CKs probadas. Se representan las RUs a los 130 s de la inyección (RUs_{130a}), respecto al cociente de las RUs observadas 50 s después del inicio de la disociación (RUs_{50d}) entre las RUs_{130a} .

4.1.2.3 Cálculo de la afinidad de CrmD por sus ligandos

Por las características de la técnica de SPR, para descartar falsos positivos, toda unión detectada debe ser confirmada mediante el cálculo de su afinidad. Por ello, se repitieron los ensayos de unión con un *chip* CM4 acoplado con CrmD a baja densidad, ~500 RUs y a un flujo alto (30 μ l/min). En estas condiciones, no se detectó la unión de TWEAK y por ello, se descartó como posible ligando de CrmD. Así mismo, tampoco se observó unión de las mCKs con $RU_{S130a} < 100$ RUs y $RU_{S50d}/RU_{S130a} < 0,5$: mCCL20, mCCL21, mCCL28 y mCXCL12 α (Figura 15B). El resto de las interacciones, tanto de TNFSFLs como de CKs, se mantuvieron, con lo que se prosiguió a definir las afinidades por estas citoquinas.

Como se detalla en la Tabla 7, CrmD fue capaz de unir con muy alta afinidad mTNFSFLs y mCKs. El mTNF α fue la citoquina que interactuó con CrmD con mayor afinidad ($K_D = 0,10$ nM). La vida media del complejo CrmD-mTNF α fue de 346,9 min (~6 h), lo que da idea de la gran estabilidad de esta unión. Mucho más inestables son las uniones de CrmD a otros TNFSFLs, con una vida media que oscila entre los 2,7 min y los 67,6 min. Esto sugiere que CrmD es un vTNFR adaptado principalmente para la interacción con el TNF α . Sorprendentemente, la mLT α 1 β 2 se unió a CrmD con mejor afinidad ($K_D = 16,70$ nM) que la mLT α 2 β 1 ($K_D = 100,00$ nM) que, estructuralmente, es más similar a la mLT α ($K_D = 4,27$ nM). CrmD unió con buena afinidad mAPRIL ($K_D = 62,60$ nM) y mLIGHT ($K_D = 289,00$ nM), pero a pesar de ello, estas interacciones presentaron constantes de asociación (K_a) dos órdenes de magnitud inferiores a las K_a de otros complejos, con lo que CrmD podría no interferir con las funciones de estas citoquinas.

La mayoría de las CKs se unen a sus receptores con una afinidad del orden nM y como se ve en la Tabla 7, CrmD presenta una K_D por mCKs que va desde 4,87 hasta 40,20 nM. Por lo tanto, CrmD podría inhibir eficientemente la unión de estas mCKs a sus CKRs celulares. mCCL27, una CK expresada en la piel, es una de las mCKs que CrmD une con más afinidad ($K_D = 5,41$ nM). Este dato está de acuerdo con el hecho de que CrmD sea expresado por ECTV, cuya vía de entrada natural en el hospedador es la piel. Así, la interacción CrmD-mCCL27 podría tener importantes implicaciones en la patogénesis de este virus.

Tabla 7. Afinidades de CrmD por sus ligandos de ratón, mTNFSFLs y mCKs, calculadas mediante SPR. Distintas concentraciones de las diferentes citoquinas se inyectaron a 30 μ l/min sobre un *chip* CM4 acoplado con pocas unidades de CrmD (~500 RUs). Los sensogramas fueron alineados y ajustados a un modelo global de Langmuir 1:1 mediante el programa informático Biaevaluation 3.2. Se muestran las constantes de afinidad (K_D) obtenidas, junto con sus respectivas constantes de asociación (K_a) y disociación (K_d) acompañadas de su error estándar (EE) entre paréntesis. Se indica el nombre común de las citoquinas, acompañado entre paréntesis del nombre sistemático. Mediante la fórmula $t_{1/2} = (\ln(2)/K_d)/60$ se determine, en min, la vida media en cada caso para comparar la estabilidad de los complejos.

		K_a (EE) [1/Ms]	K_d (EE) [s^{-1}]	K_D [nM]	$t_{1/2}$ (min)
mTNFSFLs	mLT α (1)	$2,31 \times 10^5$ (825)	$9,86 \times 10^{-4}$ ($1,13 \times 10^{-5}$)	4,27	11,7
	mTNF α (2)	$3,27 \times 10^5$ ($1,95 \times 10^3$)	$3,33 \times 10^{-5}$ ($7,42 \times 10^{-6}$)	0,10	346,9
	mLT α 1 β 2 (3A)	$1,03 \times 10^5$ (762)	$1,72 \times 10^{-3}$ ($2,31 \times 10^{-5}$)	16,70	6,7
	mLT α 2 β 1 (3B)	$4,25 \times 10^4$ ($1,35 \times 10^3$)	$4,27 \times 10^{-3}$ ($4,89 \times 10^{-5}$)	100,00	2,7
	mAPRIL (13)	$2,73 \times 10^3$ (90,2)	$1,71 \times 10^{-4}$ ($4,98 \times 10^{-6}$)	62,60	67,6
	mLIGHT (14)	$6,78 \times 10^3$ (217)	$1,96 \times 10^{-3}$ ($3,03 \times 10^{-5}$)	289,00	5,9
mCKs	mITAC (CXCL11)	$4,96 \times 10^5$ ($1,20 \times 10^3$)	$2,42 \times 10^{-3}$ ($2,75 \times 10^{-5}$)	4,87	4,8
	mSDF1 β (CXCL12 β)	$5,61 \times 10^5$ ($1,24 \times 10^4$)	$9,31 \times 10^{-3}$ ($6,56 \times 10^{-5}$)	16,60	1,2
	mBCA1 (CXCL13)	$1,61 \times 10^5$ ($4,82 \times 10^3$)	$2,12 \times 10^{-3}$ ($3,18 \times 10^{-5}$)	13,20	5,4
	mBRAK1 (CXCL14)	$1,02 \times 10^6$ ($8,10 \times 10^4$)	$4,10 \times 10^{-2}$ ($2,70 \times 10^{-3}$)	40,20	0,3
	mMPIF2 (CCL24)	$3,18 \times 10^5$ ($5,00 \times 10^3$)	$2,87 \times 10^{-3}$ ($4,50 \times 10^{-5}$)	9,00	4,0
	mTECK (CCL25)	$4,05 \times 10^5$ ($2,25 \times 10^3$)	$1,97 \times 10^{-3}$ ($2,11 \times 10^{-5}$)	4,86	5,9
	mCTACK (CCL27)	$6,89 \times 10^5$ ($1,32 \times 10^4$)	$3,72 \times 10^{-3}$ ($3,69 \times 10^{-5}$)	5,41	3,1

4.1.3 Inhibición de la actividad de los TNFSFLs por CrmD

4.1.3.1 CrmD inhibe la unión del TNF α a su receptor celular pero no la de APRIL

La alta afinidad de CrmD por TNF α sugiere que su interacción podría competir la unión del TNF α a su receptor celular, una interacción que se da con una afinidad de 0,35-1,23 nM (Reed y cols., 1997). Se comprobó esta hipótesis mediante un ensayo de SPR con un *chip* CM4 acoplado con 1.000 RU de la proteína mTNFR2Fc purificada de baculovirus. Esta proteína contiene la región extracelular del receptor celular mTNFR2, fusionada a una porción Fc humana. Se preincubó mTNF α (50 nM) en HBS-EP, durante 15 min en hielo, en ausencia o presencia de un exceso molar de 10 veces de CrmD (500 nM). Posteriormente, se inyectaron las mezclas sobre el *chip* de mTNFR2. Como se observa en la Figura 16A, CrmD bloqueó completamente la unión del mTNF α a su receptor. Así, se concluyó que la unión de CrmD a mTNF α inhibe eficazmente la interacción mTNF α -mTNFR2.

APRIL (TNFSFL13) es una citoquina implicada en la supervivencia, diferenciación y activación de linfocitos (Furuya y cols., 2011). Se ha descrito que es capaz de estimular la proliferación de ciertas líneas celulares *in vitro* (Hahne y cols., 1998). Sin embargo, estos experimentos tienen el problema de ser poco reproducibles y de requerir el uso de una forma de APRIL de alta actividad específica (Dillon y cols., 2006). Además todos estos ensayos se han puesto a punto con la forma humana de APRIL (hAPRIL), una citoquina que CrmD no une (Tabla 6). Se intentaron poner a punto experimentos de proliferación celular inducida por mAPRIL con distintas líneas celulares (Jurkat, NIH-3T3, A20), pero no se consiguió una estimulación del crecimiento celular suficiente para poder evaluar un posible efecto anti-APRIL de CrmD.

Para valorar esta supuesta actividad de CrmD, se decidió abordar el problema mediante un experimento de competición por SPR. Brevemente, se inyectó mAPRIL (40nM) en ausencia o presencia de CrmD o su receptor celular BCMA en solución, sobre un *chip* CM4 acoplado con BCMA. CrmD a 2 μ M, a diferencia de BCMA soluble, fue incapaz de evitar o reducir en grado alguno la unión de mAPRIL a su receptor (Figura 16B), por ello se concluyó que la unión de mAPRIL a CrmD no parece tener relevancia biológica.

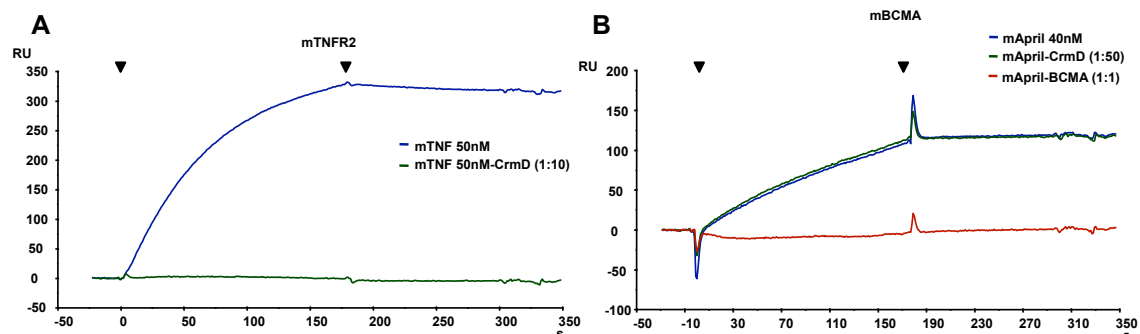


Figura 16. CrmD compite la unión de TNF α a su receptor pero no la de APRIL. A) Sensorgramas de unión a un *chip* CM4 acoplado con mTNFR2, de 50 nM mTNF α en HBS-EP en ausencia (azul) y presencia de 500 nM (1:10) de CrmD (verde). B) El receptor celular de mAPRIL, mBCMA se acopló por aminas a un *chip* CM4. Sobre este *chip*, se inyectaron 40 nM de mAPRIL en ausencia (azul) o presencia de una cantidad equimolar de mBCMA soluble (40 nM) (rojo) ó 2 μ M (1:50) de CrmD (azul) en HBS-EP y se registraron los sensorgramas de unión en cada caso a 10 μ l/min. Con triángulos invertidos se indican el inicio y el fin de la inyección.

Respecto a la posible interacción de CrmD con LIGHT, no se consiguió poner a punto ningún experimento para poder confirmar la actividad anti-mLIGHT de CrmD. LIGHT es una citoquina de membrana que interacciona con los receptores HVEM y LT β R (Ware, 2009), funcionando como una importante molécula coestimuladora de linfocitos e induciendo la expresión de CKs y otros factores proinflamatorios (Zou y cols., 2007). Se intentó establecer un ensayo de competición mediante SPR con CrmD de la unión de LIGHT a HVEM y LT β R, pero no se pudo detectar unión de un mLIGHT (R&D) soluble a ninguno de sus receptores celulares, con lo que tampoco se pudo realizar un ensayo de competición con CrmD similar a los anteriores.

4.1.3.2 CrmD inhibe la citotoxicidad mediada por TNF α , LT α y LT β

Hasta ahora se ha demostrado que CrmD es capaz de interactuar con algunos TNFSFLs. Más aún, los experimentos de competición mediante SPR demostraron que la unión de TNF α por CrmD bloquea la interacción de esta citoquina con su receptor celular, lo que potencialmente inhibiría los efectos del TNF α .

TNF α (TNFSFL2), LT α (TNFSFL1) y LT β (TNFSFL3) poseen actividad citotóxica *in vitro* en líneas celulares susceptibles como L929. Así, se plantearon una serie de experimentos con los que demostrar que CrmD era capaz de inhibir la función citotóxica de estas citoquinas. La LT α se compone de tres subunidades α mientras que la LT β es un heterotrímero $\alpha\beta$ que puede presentar dos (TNFSFL3A) o una (TNFSFL3B) subunidades β . Por lo tanto, se dispuso de un total de cuatro posibles ligandos citotóxicos de CrmD.

Al añadir estas cuatro citoquinas preincubadas con cantidades crecientes de CrmD, se consiguió bloquear de manera dosis dependiente la muerte celular inducida por la citoquina (Figura 17). Sin embargo, CrmD no bloqueó el efecto citotóxico de TRAIL (TNFSFL10), una citoquina que por SPR no se unió a CrmD (Figura 14). De acuerdo con una peor afinidad por LT α 2 β 1 (K_D = 100 nM), CrmD presentó un bajo efecto de inhibición de la muerte celular inducida por esta citoquina, llegando únicamente a un 15% de protección a la concentración probada más elevada (120 nM). Estos datos confirmaron, no sólo que CrmD une TNF α , LT α y LT β , sino que además inhibe los efectos biológicos de estas citoquinas sobre sus receptores.

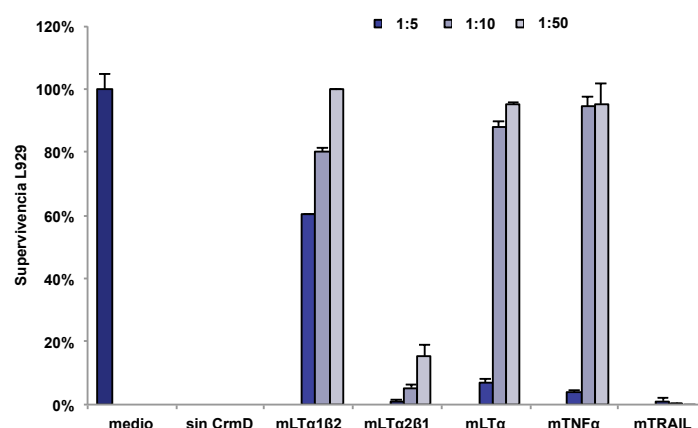


Figura 17. CrmD inhibe el efecto citotóxico de mLT α , mTNF α , mLT α 1 β 2 y en mucho menor medida de mLT α 2 β 1. Se preincubó CrmD a crecientes relaciones molares (1:5, 1:10 y 1:50), con las distintas citoquinas utilizadas a concentraciones de entre 5 y 10 veces su dosis específica 50 (ED₅₀), mLT α (40 nM), mTNF α (1,2 nM), mLT α 1 β 2 (22 nM), mLT α 2 β 1 (2,2nM) y mTRAIL (2,5 nM). La mezcla se añadió junto con 4 μ g/ml de actinomicina D a células L929 y a las 16h se estimó la supervivencia celular. Cada muestra se analizó por triplicado y se representan, junto con sus desviaciones estándar, las medias del porcentaje de células vivas en relación al valor de las muestras sin citoquina (medio). Los datos se normalizaron restando el dato de absorbancia medido en ausencia de CrmD para cada citoquina (sin CrmD).

4.1.3.3 CrmD inhibe la migración inducida por CCL25, CCL27 y CXCL13, pero no la de CXCL12 β

Con el fin de comprobar la actividad anti-CK de CrmD se llevaron a cabo experimentos de migración en *transwell*. En estos experimentos, un tipo celular específico que expresa el receptor para la CK en estudio migra a través de una membrana hacia un compartimento inferior en el que se ha preincubado la CK con cantidades crecientes de CrmD a las dosis indicadas en cada caso. La limitación de este experimento es precisamente encontrar un par CK-célula que funcione de manera significativa y consistente. Por ello, de las CKs unidas por CrmD sólo se consiguió poner a punto un experimento para cuatro de ellas: mCCL25, mCXCL12 β , mCCL27 y mCXCL13.

Así, se trabajó con células MOLT4 para la migración inducida por mCCL25, A20 para mCCL27, MonoMac1 para mCXCL12 β y esplenocitos de ratón para mCXCL13 (Figura 18). Se observó que, en las condiciones de los ensayos, CrmD consiguió inhibir, de manera dosis dependiente, la quimiotaxis inducida por mCCL25, mCCL27 y mCXCL13, pero no por mCXCL12 β , lo que sugiere que la unión de CrmD-CXCL12 β ($K_D=16,6nM$) no se da de manera eficaz para bloquear los efectos de la CK y por tanto carece de relevancia biológica. Sin embargo, la migración mediada por mCCL25, mCCL27 y mCXCL13 quedó inhibida por CrmD, lo que confirmó la actividad anti-CK *in vitro* de esta proteína de ECTV. Así por ejemplo, excesos molares de CrmD respecto a la CK de 10, 25 y 100 veces, consiguieron reducir por debajo del 50% la migración inducida por mCCL25, mCCL27 y mCXCL13, respectivamente (Figura 18). En un experimento similar, CrmD inhibió la migración inducida en células A20 por mCXCL13 (Resultados no mostrados)

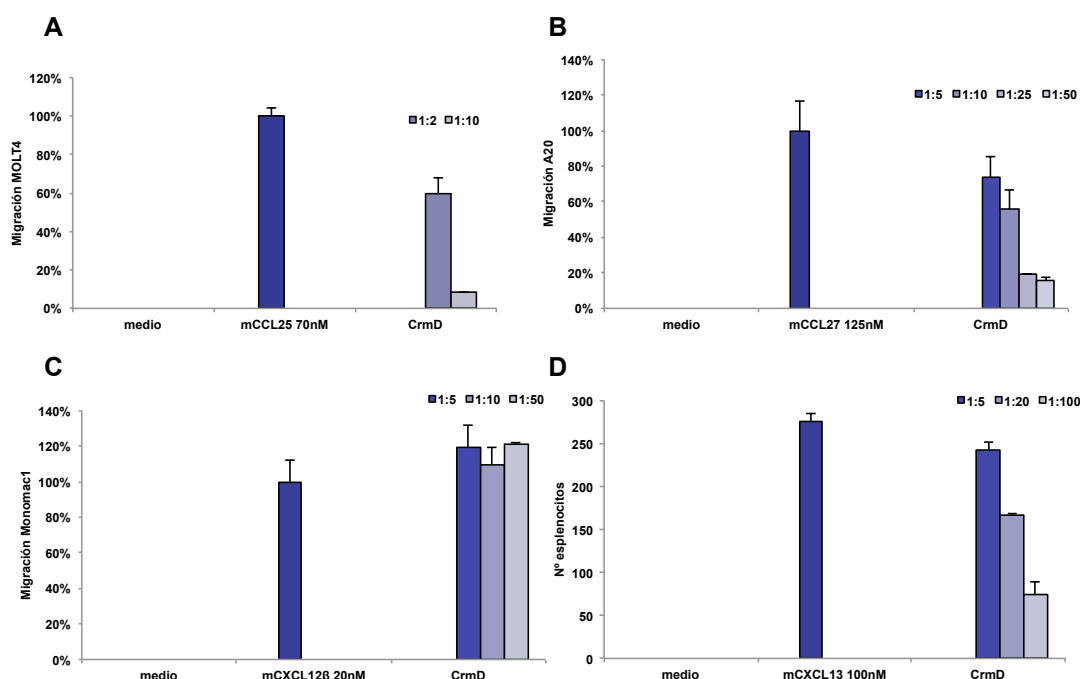


Figura 18. CrmD inhibe la migración inducida por CKs. Se llevaron a cabo experimentos de quimiotaxis con mCCL25 (A), mCCL27 (B), mCXCL12 β (C) y mCXCL13 (D). Para ello se utilizaron placas en *transwell* en las que en los pocillos inferiores se incubó la CK a la concentración indicada en cada caso, en ausencia o presencia de relaciones molares crecientes de CrmD (representadas en las leyendas). En los compartimentos superiores se añadieron 250.000 células por pocillo, utilizando células MOLT4, A20, MonoMac1 y esplenocitos de ratón, respectivamente. Tras 4 h de incubación a 37°C, se calculó el número de células que habían migrado a los pocillos inferiores. Cada condición se ensayó por triplicado y se sustrajo a todas las muestras la absorbancia detectada a 492nm en los pocillos sin CK (medio), o el número de esplenocitos que pasaron al pocillo inferior en ausencia de mCXCL13 (medio). Se muestra la media obtenida en cada caso y se representan los datos, en porcentaje, acompañados de sus desviaciones estándar, en relación a la migración obtenida en ausencia de CrmD (nombre de la CK utilizada y concentración).

4.1.4 CrmD une de manera simultánea TNFSFLs y CKs

Por tanto, CrmD es capaz de unir algunos TNFSFLs y CKs. Así, CrmD es una proteína con actividad dual, por un lado inhibiendo los efectos de los TNFSFLs y por otro, bloqueando la migración inducida por ciertas CKs. La siguiente pregunta que se planteó fue si estos dos tipos de ligandos podían unirse simultáneamente a CrmD.

Primeramente, esta hipótesis se confirmó mediante electroforesis en geles nativos (Figura 19A). Se preincubó durante 30 min en hielo, CrmD con mTNF α a una relación molar 2:1, se purificó el complejo CrmD-mTNF α mediante cromatografía de exclusión (línea 3). Posteriormente, este complejo se preincubó con mCCL27 (relación molar 1:1) y la mezcla se sometió a electroforesis en condiciones nativas (línea 5). Como se puede observar en la Figura 19A, al preincubar por separado CrmD con mTNF α y mCCL27 (línea 4), se obtuvo un complejo de igual tamaño que al añadir la CK al complejo CrmD-mTNF α preformado y mayor

que el complejo CrmD-mTNF α sin CK (línea 3). Estos resultados demostraron que la unión del mTNF α a CrmD no impide la interacción con CKs y que es posible la formación de un complejo CrmD-TNFSFL-CK.

El hecho de que CrmD posea un dominio anti-TNFSFL y otro anti-CK podría deberse a que la unión de uno de los ligandos a su dominio, modulase o mejorase la capacidad de unión del otro dominio. Para conocer si existe algún tipo de cooperatividad entre un dominio y otro, se realizaron dos ensayos de actividad complementarios. Por un lado un ensayo de citotoxicidad en el que se comparó la capacidad de CrmD de inhibir la citotoxicidad de mTNF α respecto al complejo CrmD-mCCL27 (Figura 19B) y, por otro lado, un experimento de migración inducida por mCCL25 comparando la inhibición por CrmD y por el complejo CrmD-mTNF α (Figura 19C). En ninguno de estos experimentos se detectaron indicios de que la unión de uno de los ligandos mejorase la actividad del otro dominio ya que los complejos CrmD-mTNF α y CrmD-mCCL27 se comportaron en ambos casos de una manera equivalente a CrmD libre (Figura 19B y 19C). Esto sugiere que existe una independencia funcional y no sólo estructural, del dominio CRD y SECRET de CrmD.

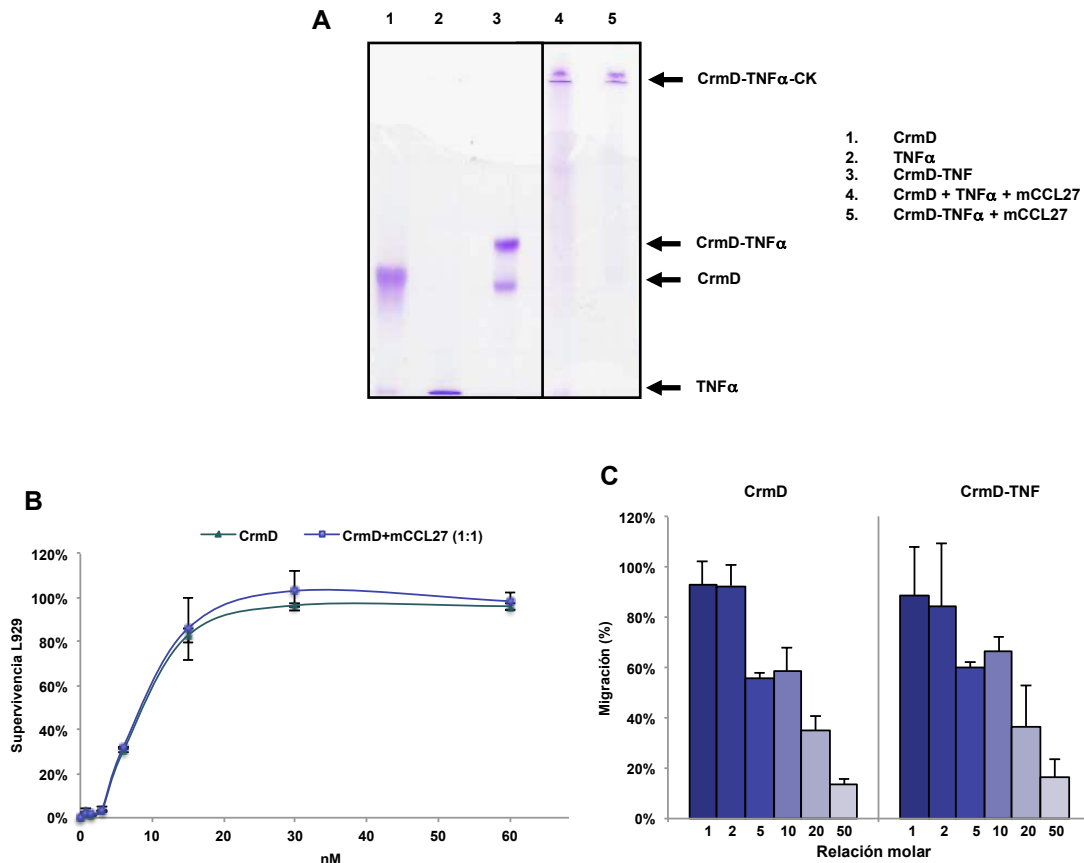


Figura 19. CrmD une de manera simultánea TNFSFs y CKs. A) Electroforesis seguida de tinción con azul de Coomassie, en gel nativo homogéneo al 12,5% de poliacrilamida que muestra la formación de los distintos complejos de CrmD con sus ligandos. 4 μ g de CrmD (1), mTNF α (2), o el complejo CrmD-mTNF α previamente purificado (3), fueron sometidos a electroforesis utilizando el sistema PhastSystem de GE Healthcare. De igual forma, se analizaron 4 μ g de las mezclas de CrmD con mTNF α y mCCL27 (2:1:2) (4) y de CrmD-mTNF α con mCCL27 (1:1) (5), tras ser incubados 15 minutos en hielo. B) Ensayo de citotoxicidad con células L929 en el que se incubó 1,2 nM de mTNF α con concentraciones crecientes de CrmD (verde) o de la mezcla CrmD+mCCL27 (azul) en presencia de 4 μ g/ml de actinomicina D. A las 16h se estimó la supervivencia celular en cada muestra, analizada por triplicado. C) Ensayo de migración de células MOLTA4 inducida con 50 nM de mCCL25. Se compara el porcentaje de migración obtenido cuando la CK se incubó con las relaciones molares crecientes, indicadas en el eje de abscisas, de CrmD y el complejo CrmD-mTNF α . Tras 4 h de migración a 37°C, se calculó el número de células que habían migrado a los pocillos inferiores en cada condición, realizada por triplicado. Tanto en B) como en C) se representan las medias obtenidas junto con sus desviaciones estándar.

4.1.5 Caracterización molecular de los dos dominios de CrmD

4.1.5.1 Caracterización de las propiedades de unión mediante SPR de los dos dominios de CrmD

La proteína CRD-CrmD contiene únicamente el dominio de unión al TNF de CrmD (Figura 20A). Anteriormente, Alejo y cols. en el laboratorio, observaron que la versión corta equivalente de CrmB mantenía intactas las propiedades anti-TNFSFL de la proteína completa (Alejo y cols., 2006). Aquel trabajo, en cambio, no describía una forma truncada del dominio SECRET con las mismas propiedades anti-CK que la proteína completa. Con el fin de conseguir una forma corta completamente activa del dominio SECRET de CrmD, se purificaron dos versiones de este dominio, CrmD163 y CrmD181 (Figura 20A). En una primera aproximación, 250 ng de las proteínas recombinantes CrmD, CRD-CrmD, CrmD163 y CrmD181 (Figura 20A), generadas y purificadas de la misma manera, se acoplaron covalentemente a *chips* CM4 a niveles de respuesta similares (~3000 RU). Se inyectaron sobre los *chips* 100 nM de mTNF α y mCCL25 y se confirmó que cada proteína tenía la capacidad de unión esperada. Como ya se ha mostrado, la proteína CrmD completa unió tanto el mTNF α como mCCL25, mientras que la proteína CRD-CrmD unió mTNF α pero no mCCL25 y las dos versiones del dominio SECRET sólo unieron mCCL25 (Figura 20).

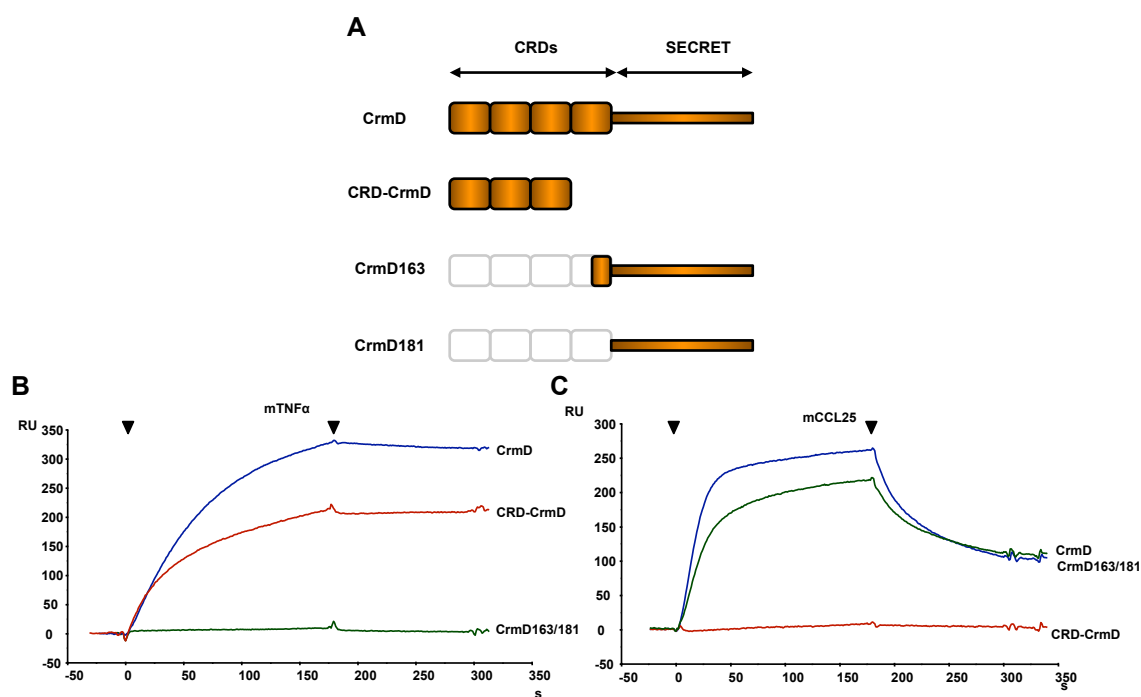


Figura 20. Unión por SPR de mTNF α y mCCL25 a CrmD, CRD-CrmD, CrmD 163 y CrmD181. A) Esquema de las proteínas expresadas en el sistema de baculovirus y purificadas. En naranja se indican las regiones de la proteína completa incluidas en la secuencia de las proteínas recombinantes expresadas. CrmD (azul), CRD-CrmD (rojo), CrmD163/CrmD181(verde) purificados, se acoplaron covalentemente a *chips* CM4 a alta densidad (~3000 RU). 100 nM de mTNF α (B) y de mCCL25 (C) en HBS-EP fueron inyectados sobre los *chips* a 10 μ l/min. Se muestran los sensorgramas recogidos en cada caso con una única curva modelo para las dos formas del dominio SECRET. Con triángulos invertidos se indican el inicio y fin de la inyección.

Posteriormente, se determinó la afinidad por las CKs de CrmD163 y CrmD181. Para ello, se acoplaron nuevos *chips* con menores cantidades de proteína recombinante. Como se puede ver en la Tabla 8, la construcción CrmD181 presentó afinidades peores en comparación con CrmD y CrmD163. Por ejemplo, para mCCL25, la proteína completa y la versión truncada más larga (CrmD163) presentaron afinidades de 4,86 y 5,99 nM, respectivamente. Sin embargo, CrmD181 la unió con una K_D superior a 50 nM, es decir, la afinidad fue 10 veces peor. Las diferencias fueron más evidentes para mCCL27, mientras CrmD y CrmD163 la unieron con una afinidad 5,41 y 7,91 nM, respectivamente, CrmD181 la unió con una afinidad dos órdenes de magnitud mayor (K_D = 288 nM).

Estos resultados sugieren que la secuencia de CrmD163 engloba la totalidad del dominio SECRET y que en la construcción CrmD181 se pierden algunos residuos importantes para la interacción con CKs. Al mismo tiempo, se puede concluir que la interacción de CrmD con los TNFSFLs sólo requiere de los tres primeros CRDs de la proteína (hasta la K¹⁵¹) seguidos del dominio SECRET que uniría CKs.

Tabla 8. Constantes de afinidad de CrmD, CrmD163 y CrmD181, por CKs calculadas por SPR. Los sensorgramas recogidos para distintas concentraciones de cada CK, se alinearon y analizaron mediante el programa informático Biaevaluation 3.2, ajustándolos a un modelo global de Langmuir 1:1. n.a. (no analizado).

	K _D (nM)		
	CrmD	CrmD163	CrmD181
mCCL25	4,86	5,99	54,70
mCXCL12β	16,6	7,65	22,80
mCCL27	5,41	7,91	288,00
mCXCL13	13,20	11,40	n.a.
mCXCL11	4,87	4,06	n.a.

4.1.5.2 CRD-CrmD y CrmD163 muestran una actividad comparable a CrmD frente al TNFα y las CKs, respectivamente

Para ratificar los resultados derivados de los experimento de SPR, se llevaron a cabo experimentos *in vitro* que corroborasen que, efectivamente, las afinidades por las CKs de CrmD163 suponían una capacidad similar a CrmD de bloquear las CKs.

La construcción CrmD163 carece del dominio de unión a TNFSFLs, por lo tanto, primeramente se decidió confirmar que esta proteína no inhibía la acción del TNFα, como sería de esperar al no detectar unión mediante SPR. Para ello, se llevó a cabo un experimento de citotoxicidad en células L929 en presencia de cantidades crecientes de proteína recombinante purificada. De esta manera, mientras que fue suficiente una relación molar mTNFα:proteína CrmD 1:10 para neutralizar el efecto citotóxico de mTNFα (1,2 nM) y mantener un 100% de viabilidad celular, no se obtuvo ningún efecto protector en presencia de CrmD163 con un exceso molar de hasta 10 veces (Figura 21A). En experimentos posteriores, se incrementó la relación molar mTNFα:CrmD163 hasta 1:100, sin observarse signos de protección (resultados no mostrados). Por su parte, la proteína CrmD-CRD fue capaz de inhibir el efecto citotóxico del mTNFα de manera similar a CrmD (Figura 21A).

Sin embargo, en un ensayo de migración *in vitro*, CrmD163 tuvo un comportamiento similar a CrmD (Figura 21B). Se llevó a cabo un ensayo de migración de células MOLT4 inducida por mCCL25 (100 nM) en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de la proteína recombinante en estudio. mCCL25 es una de las CKs que CrmD (K_D= 4,86 nM) y CrmD163 (K_D= 5,99 nM) unen con mayor afinidad (Tabla 8). Como se muestra en la Figura 21B, CrmD163 fue capaz de bloquear eficientemente la migración inducida por mCCL25 al menos al mismo nivel que la proteína completa, de hecho un exceso molar de 5 veces fue suficiente para inhibir más del 80% de la migración inducida por la CK en ambos casos. Por su parte, la proteína CRD-CrmD, que únicamente une TNF, no tuvo ningún efecto sobre la migración de las células.

De esta manera, se consiguió una versión del SECRET con una capacidad anti-CK equiparable a la presentada por CrmD y candidata para el estudio *in vivo* del papel que este dominio puede desempeñar en la patogénesis de ECTV.

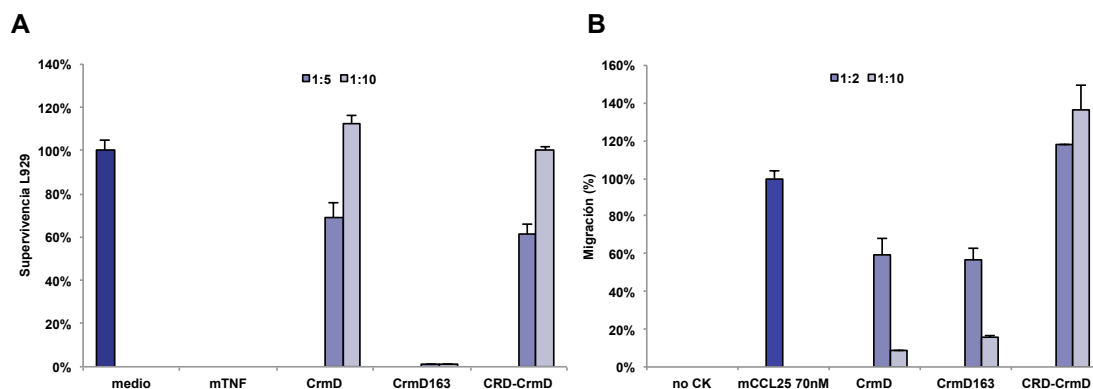


Figura 21. CrmD163 inhibe de manera equivalente a CrmD la migración inducida por mCCL25 pero no inhibe el efecto citotóxico del mTNF α . A) Experimento de citotoxicidad en el que el efecto del mTNF α (1,2 nM) se intentó inhibir con CrmD, CRD-CrmD y CrmD163 a las relaciones molares TNF:proteína indicadas. Las muestras se analizaron por triplicado. Se muestran las medias y las desviaciones estándar. Como control de viabilidad celular se analizaron muestras en ausencia de mTNF α (medio). B) Ensayo de migración de células MOLT4 inducida por 70 nM de mCCL25. La CK se incubó, por triplicado, con CrmD, CRD-CrmD y CrmD163 a las relaciones molares CK:proteína indicadas.

Estos resultados sugieren que las actividades, anti-TNFSFLs y anti-CKs, de CrmD son llevadas a cabo por los tres primeros CRDs hasta el aminoácido K¹⁵¹ y un dominio SECRET que comienza en el residuo F¹⁶³, respectivamente. Por ello, en adelante se hará referencia a CrmD como un vTNFR con tres CRDs en el extremo amino terminal.

4.2 Análisis por mutagénesis dirigida del dominio de unión a TNF de CrmD

Los vTNFRs se caracterizan por mimetizar la región extracelular de los TNFRs celulares. Esta región presenta hasta cuatro CRDs que median la interacción con el ligando. Hasta la fecha, han sido cristalizados los complejos TNFR1-LT α (Banner y cols., 1993) y TNFR2-TNF α (Mukai y cols., 2010). CrmE es el único vTNFR cuya estructura molecular ha sido resuelta (Graham y cols., 2007). En este estudio demostraron que CrmE adopta una estructura global muy similar a los dos receptores celulares, pero con características propias importantes que hacen que por ejemplo CrmE sea incapaz de unir LT α . En todos estos trabajos se habla de dos regiones clave para la unión del receptor al ligando. Una primera zona llamada “*loop* de los 50” localizada en el CRD2 que contendría los residuos determinantes de la afinidad de la interacción y una segunda zona, en el CRD3 conocida como “*loop* de los 90” que estaría involucrada en una modulación fina de la afinidad y sobre todo de la especificidad. El CRD3 podría estar determinando por tanto, que CrmC y CrmE unan TNF α pero no LT α o que existan diferencias en la especificidad de todos estos inhibidores virales por diferentes ligandos.

4.2.1 Expresión de mutantes en el dominio de unión a TNFSFLs de CrmD

Para entender las bases moleculares de la afinidad y especificidad de CrmD, se generaron 14 mutantes distintos a lo largo del dominio de unión a TNFSFLs de la proteína CrmD (aminoácidos 20-151) (Figura 22A). Para ello, se diseñaron 14 pares de oligonucleótidos que incorporaron en la secuencia la mutación deseada. Estos oligonucleótidos, con la mutación resaltada en rojo, pueden consultarse en la Tabla 5 de Materiales y Métodos. A la hora de decidir las mutaciones a realizar, se tuvieron en cuenta los estudios previos sobre la interacción TNF–TNFRs y los distintos papeles atribuidos a cada uno de los CRDs en la unión al ligando (Banner y cols., 1993; Mukai y cols., 2010). Se trató de abarcar todas las posibilidades realizando cambios en cada uno de los tres CRDs y mutando tanto residuos conservados como no conservados (Figura 22B).

El CRD1 parece ser importante para la oligomerización del receptor. De hecho, este CRD1 se le conoce también como PLAD, por *PreLigand Assembly Domain*, lo que sugiere un papel en la regulación de la formación, previa a la unión del ligando, de complejos del receptor (Chan y cols., 2000). Sin embargo, el trabajo sobre la estructura del complejo TNFR2-TNF α (Mukai y cols., 2010), sugiere que no sólo el PLAD, sino también la propia unión del ligando y la señalización, son críticos para que finalmente exista una eficaz oligomerización del receptor. Esta misma función se ha sugerido para el CRD1 de los vTNFRs, sin embargo, no existen evidencias suficientes que corroboren este hecho y además la hipotética secuencia consenso del PLAD no está suficientemente conservada entre los vTNFRs de poxvirus (Graham y cols., 2007). Para estudiar estos detalles se diseñaron dos mutantes, Mut1 y Mut8 para los residuos más conservados dentro del CRD1 (Figura 22A).

Los principales residuos que median la unión con el ligando y son responsables de gran parte de la afinidad de la interacción, se reúnen en una región del CRD2 conocida como “*loop* de los 50”. Este *loop* está conservado y solapa perfectamente en todos los receptores de TNF cuya estructura ha sido resuelta. Sin embargo, existe otra zona en el CRD3 de vital importancia para definir la especificidad de la unión, el “*loop* de los 90”. Esta región presenta mayor diversidad entre los TNFRs atribuyendo a cada uno de ellos propiedades únicas. Teniendo presentes estos datos se diseñaron 12 mutantes del CRD2 y CRD3 dentro y fuera de los *loops* conservados (Figura 22A y B).

Así, mediante el sistema de baculovirus se expresaron los 14 mutantes distintos que se purificaron por cromatografía de afinidad con resinas de níquel Ni-NTA. Las proteínas se eluyeron de la columna mediante concentraciones crecientes de imidazol para posteriormente, juntar y concentrar las fracciones ricas en proteína y dializarlas en PBS. Cabe destacar que en todos los casos se consiguieron rendimientos de expresión similares y que todas las proteínas tenían, salvo pequeñas variaciones, propiedades electroforéticas equivalentes (Figura 22C).

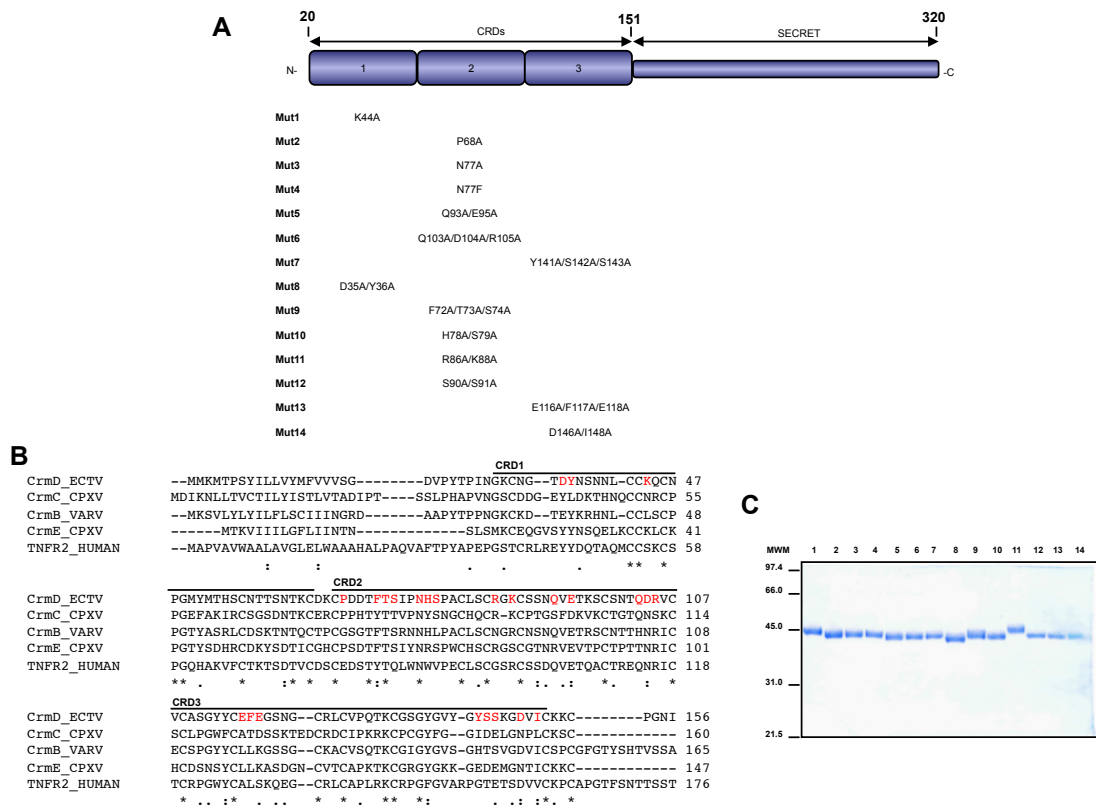


Figura 22. Expresión de los 14 mutantes de CrmD generados. A) Esquema representativo de la posición de cada mutante en la estructura de CrmD. Las proteínas Mut1 y el Mut8 son cambios en el CRD1. Mut7, Mut13 y Mut14 corresponden a mutaciones en el CRD3 y el resto afectan al CRD2. En la parte superior se indica la posición de los aminoácidos en la secuencia de la proteína. B) Alineamiento realizado mediante CLUSTALW en el que se comparan las secuencias de los tres primeros CRDs de hTNFR2 (Uniprot/TrEMBL n° P20333), CrmD_ECTV (gen E6, ECTV cepa Naval, Uniprot/TrEMBL n° O57300), CrmB_VARV (gen G2R, VARV cepa Bangladesh 1975, UniProt/TrEMBL n° P34015), CrmE_CPXV (gen K3R, CPXV Elefantopox, Uniprot/TrEMBL n° Q9DJL2) y CrmC_CPXV (gen CPXV191, CPXV cepa Brighton Red, Uniprot/TrEMBL n° Q9YP87). C) Gel teñido con azul de Coomassie mostrando el estado de pureza de cada uno de los mutantes purificados (Mut1-Mut14). MWM: marcadores de masa molecular en kDa.

4.2.2 Las mutaciones en el dominio anti-TNFSFLs de CrmD no afectan a la capacidad anti-CK de la proteína

En primer lugar, se comprobó que los cambios realizados en la secuencia no afectarían a la estructura global de CrmD y, más concretamente, al dominio SECRET. Para ello, se probó la capacidad de cada uno de los mutantes de inhibir la migración de células MOLT4 inducida por mCCL25, en comparación con la proteína parental. En todos los casos, se observó una eficaz inhibición de la migración de manera dosis dependiente y equivalente a la inhibición producida tanto por CrmD como por CrmD163, de manera que, a una relación molar CCL25:proteína de 1:10 se consiguió reducir la migración al 20% en todos los casos excepto en el caso de la proteína CRD-CrmD que no inhibió la quimiotaxis a ninguna de las concentraciones probadas (Figura 23).

Este dato demostró que los cambios realizados en la secuencia de aminoácidos de CrmD, no afectaron nunca a la estructura global de la proteína, validando nuestros mutantes para el estudio de sus propiedades de unión de TNFSFLs.

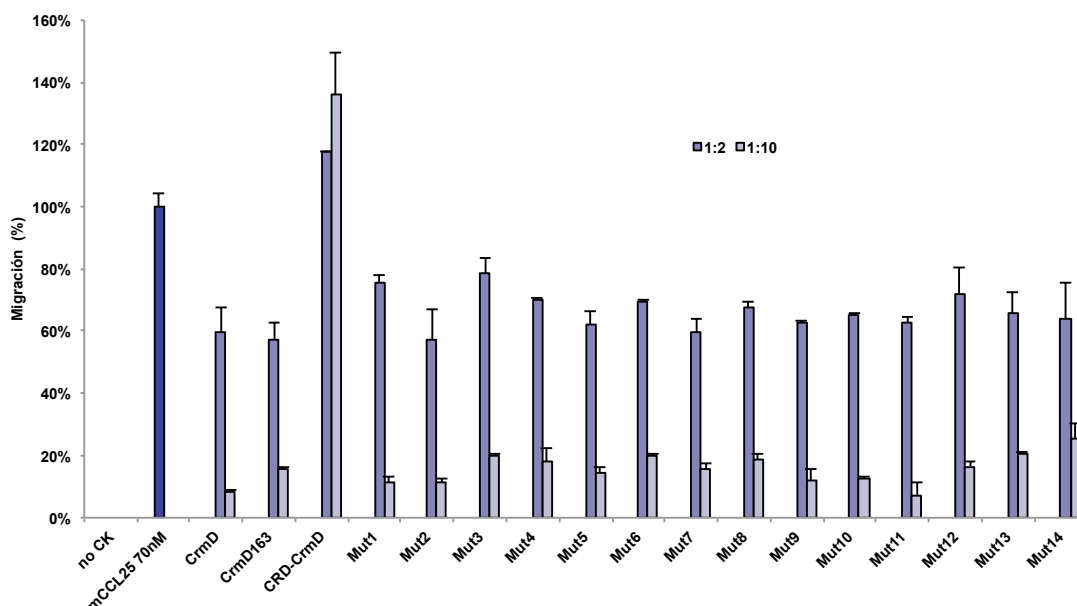


Figura 23. Los mutantes de CrmD inhiben eficientemente la migración inducida por mCCL25. CrmD, CrmD163, CRD-CrmD y Mut1-14 se incubaron con 70 nM de mCCL25 a relaciones molares CK:proteína 1:2 y 1:10. Se ensayó por triplicado la capacidad de cada proteína de inhibir la migración de células MOLT4 en ensayos en *transwell*. Se representan las medias de los datos en porcentaje en referencia a la migración observada en ausencia de inhibidor (mCCL25 70 nM), indicando la desviación estándar en cada caso. Los datos se normalizaron con la migración en pocillos sin CK (no CK).

4.2.3 Caracterización de la unión de TNFSFLs de los mutantes de CrmD

Como ya se ha demostrado, CrmD une tanto las formas humanas como de ratón del TNF α y la LT α (Tabla 6). Además, se ha visto que CrmD une con muy alta afinidad el mTNF α (K_D = 0,10 nM) y la mLT α (K_D =4,27 nM) (Tabla 7). Con el fin de evaluar, si la unión a CrmD de los TNFSFLs humanos y murinos, presentaban distintas bases moleculares, se determinó mediante SPR la afinidad por mTNF α , mLT α , hTNF α y hLT α de los 14 mutantes de CrmD purificados.

Dentro del CRD1 se generaron dos mutantes, Mut1 y Mut8 (Figura 22A). Ambas son mutaciones dentro de la hipotética secuencia consenso del PLAD, el dominio implicado en la oligomerización del receptor. Este hecho ha sido demostrado para los TNFR celulares, pero sigue sin estar claro si funciona de manera similar en los vTNFRs. La estructura de CrmE sugiere que este CRD1 sería de vital importancia para el mantenimiento de un plegamiento apropiado del CRD2, pero descarta una posible implicación en la oligomerización de CrmE (Graham y cols., 2007). En el caso de CrmD, el Mut1 no presentó cambios en su afinidad por TNF α y LT α y el Mut8 mostró una reducción de un logaritmo en su afinidad por todos los ligandos, excepto por hLT α , con la que no se detectó unión (Figura 24). Sin embargo, en un ensayo de exclusión molecular en columna S200, el Mut8 presentó el mismo volumen de exclusión que la proteína CrmD (resultados no mostrados). Por tanto, esto sugiere que ninguno de los residuos modificados en estos dos mutantes, K⁴⁴, D³⁵ y Y³⁶, que están altamente conservados en el CRD1 de los TNFRs, están mediando la oligomerización de CrmD, pero dada la menor afinidad mostrada por el Mut8, podrían ser importantes estructuralmente para el adecuado plegamiento del CRD2.

Se generaron 9 mutantes en el CRD2. Tres de ellos, Mut4, Mut6 y Mut9 no fueron capaces de unir ninguna citoquina (Figura 23). Estos tres mutantes corresponden a cambios dentro del CRD2 (Figura 22A), el dominio que se ha sugerido como el que alberga los principales residuos para la interacción con el ligando. Además, el Mut4 y el Mut9 afectan a aminoácidos dentro del “loop de los 50”. Sin embargo, el Mut10, que también consiste en cambios dentro de este loop, presentó un comportamiento similar a CrmD, sugiriendo que los residuos H⁷⁸ y S⁷⁹ no están implicados en la interacción. Por su parte el Mut6, dentro del CRD2 pero

fuera de la secuencia del “*loop* de los 50”, se mostró completamente inactivo frente a cualquiera de las citoquinas probadas (Figura 24). Es significativo el hecho de que una proteína similar al Mut4 (N77F), el Mut3 (N77A), mantenga la actividad de CrmD (Figura 24). Esto sugiere que la incorporación de un residuo aromático en la posición N⁷⁷ provoca un fuerte impedimento en la unión al ligando. Por otro lado, el Mut3, con una afinidad similar a la de CrmD por el mTNF α , tuvo una pérdida de un orden de magnitud en su afinidad por hTNF α , lo que resalta la importancia del residuo N⁷⁷ y le otorga una función distinta en la formación de contactos con el hTNF α que con el mTNF α .

Recientemente, ha sido cristalizado el complejo TNF α -TNFR2 (Mukai y cols., 2010). Este trabajo determinó dos zonas en el receptor directamente implicadas en la unión del TNF α . En una de estas regiones el aminoácido R⁷⁷ establece enlaces importantes con el ligando. El residuo equivalente en la secuencia de CrmD, K⁸⁸, fue mutado en el Mut11 pero mostró afinidades similares a la proteína parental por todas las citoquinas (Figura 24).

mTNF α	Ka (EE) [1/MS]	Kd (EE) [1/s]	KD [nM]	t _{1/2} (min)	hTNF α	Ka (EE) [1/MS]	Kd (EE) [1/s]	KD [nM]	t _{1/2} (min)
CrmD_ECTV	3,27 x 10 ⁵ (1,95 x 10 ³)	3,33 x 10 ⁻⁵ (7,42 x 10 ⁻⁶)	0,10	346,9	CrmD_ECTV	9,64 x 10 ⁵ (2,52 x 10 ³)	3,94 x 10 ⁻⁴ (9,35 x 10 ⁻⁶)	0,41	29,3
Mut1	2,81 x 10 ⁵ (621)	2,90 x 10 ⁻⁵ (7,03 x 10 ⁻⁶)	0,10	398,4	Mut1	8,49 x 10 ⁵ (3,24 x 10 ³)	3,24 x 10 ⁻⁴ (1,07 x 10 ⁻⁵)	0,40	35,7
Mut2	4,07 x 10 ⁵ (1,16 x 10 ³)	6,07 x 10 ⁻⁵ (5,79 x 10 ⁻⁶)	0,15	190,3	Mut2	1,11 x 10 ⁶ (3,12 x 10 ³)	2,90 x 10 ⁻⁴ (8,24 x 10 ⁻⁶)	0,26	39,8
Mut3	4,75 x 10 ⁵ (1,76 x 10 ³)	2,59 x 10 ⁻⁴ (1,12 x 10 ⁻⁵)	0,55	44,6	Mut3	1,56 x 10 ⁶ (2,59 x 10 ⁴)	4,59 x 10 ⁻³ (1,33 x 10 ⁻⁴)	2,47	2,5
Mut4	nbd	nbd	nbd	nbd	Mut4	nbd	nbd	nbd	nbd
Mut5	3,19 x 10 ⁵ (849)	2,87 x 10 ⁻⁴ (1,10 x 10 ⁻⁵)	0,90	40,3	Mut5	1,54 x 10 ⁶ (1,01 x 10 ⁴)	1,70 x 10 ⁻³ (2,19 x 10 ⁻⁵)	1,11	6,8
Mut6	nbd	nbd	nbd	nbd	Mut6	nbd	nbd	nbd	nbd
Mut7	3,05x 10 ⁵ (3,05 x 10 ³)	2,62 x 10 ⁻⁴ (3,51 x 10 ⁻⁵)	0,86	44,1	Mut7	1,47 x 10 ⁶ (1,22 x 10 ⁴)	3,27x 10 ⁻³ (9,64 x 10 ⁻⁵)	2,23	3,5
Mut8	3,75 x 10 ⁵ (2,30 x 10 ³)	6,50 x 10 ⁻⁴ (6,64 x 10 ⁻⁵)	1,73	17,8	Mut8	2,08 x 10 ⁶ (3,10x 10 ⁴)	4,50x 10 ⁻³ (2,22 x 10 ⁻⁴)	2,16	2,6
Mut9	nbd	nbd	nbd	nbd	Mut9	nbd	nbd	nbd	nbd
Mut10	2,97x 10 ⁵ (2,99 x 10 ³)	2,39x 10 ⁻⁴ (3,26 x 10 ⁻⁵)	0,80	48,3	Mut10	1,61 x 10 ⁶ (5,81 x 10 ³)	8,19x 10 ⁻⁴ (1,61 x 10 ⁻⁵)	0,51	14,1
Mut11	3,13 x 10 ⁵ (1,47 x 10 ³)	2,30 x 10 ⁻⁴ (4,49 x 10 ⁻⁵)	0,73	50,2	Mut11	1,16 x 10 ⁶ (3,72 x 10 ³)	6,28 x 10 ⁻⁴ (1,06 x 10 ⁻⁵)	0,54	18,4
Mut12	2,34 x 10 ⁵ (439)	2,36 x 10 ⁻⁴ (5,96 x 10 ⁻⁵)	1,01	49,0	Mut12	1,59 x 10 ⁶ (7,90 x 10 ³)	1,11 x 10 ⁻³ (1,61 x 10 ⁻⁵)	0,70	10,4
Mut13	2,29 x 10 ⁵ (1,45 x 10 ³)	1,93x 10 ⁻⁴ (6,35 x 10 ⁻⁵)	0,84	59,9	Mut13	1,07 x 10 ⁶ (8,63x 10 ³)	1,25 x 10 ⁻³ (1,35 x 10 ⁻⁴)	1,17	9,2
Mut14	4,91 x 10 ⁵ (2,55 x 10 ³)	4,35 x 10 ⁻⁴ (4,47 x 10 ⁻⁵)	0,89	26,6	Mut14	2,12 x 10 ⁶ (2,23 x 10 ⁴)	3,10 x 10 ⁻³ (1,28x 10 ⁻⁴)	1,46	3,7
mLT	Ka (EE) [1/MS]	Kd (EE) [1/s]	KD [nM]	t _{1/2} (min)	hLT	Ka (EE) [1/MS]	Kd (EE) [1/s]	KD [nM]	t _{1/2} (min)
CrmD_ECTV	2,31 x 10 ⁵ (825)	9,86 x 10 ⁻⁴ (1,13 x 10 ⁻⁵)	4,27	11,7	CrmD_ECTV	5,97 x10 ⁴ (467)	3,01 x 10 ⁻³ (2,68 x 10 ⁻⁵)	50,40	3,8
Mut1	1,20 x 10 ⁵ (2,32 x 10 ³)	5,93 x 10 ⁻⁴ (2,15 x 10 ⁻⁵)	4,95	19,5	Mut1	4,01 x 10 ⁴ (462)	3,04 x 10 ⁻³ (2,59 x 10 ⁻⁵)	75,80	3,8
Mut2	2,66 x 10 ⁵ (2,89 x 10 ³)	1,26 x 10 ⁻³ (3,35 x 10 ⁻⁵)	4,71	9,2	Mut2	1,22 x 10 ⁵ (1,03 x 10 ³)	2,36 x 10 ⁻³ (2,36 x 10 ⁻⁵)	19,30	4,9
Mut3	2,24 x 10 ⁴ (2,74 x 10 ³)	1,39 x 10 ⁻³ (6,08 x 10 ⁻⁵)	62,00	8,3	Mut3	5,56 x 10 ⁵ (1,99 x 10 ⁴)	0,0411 (8,39 x 10 ⁻⁴)	73,90	0,3
Mut4	nbd	nbd	nbd	nbd	Mut4	nbd	nbd	nbd	nbd
Mut5	2,84 x 10 ⁵ (2,80 x 10 ³)	3,20 x 10 ⁻³ (6,38 x 10 ⁻⁵)	11,20	3,6	Mut5	nbd	nbd	nbd	nbd
Mut6	nbd	nbd	nbd	nbd	Mut6	nbd	nbd	nbd	nbd
Mut7	4,08 x 10 ⁴ (362)	2,07 x 10 ⁻³ (2,79 x 10 ⁻⁵)	50,60	5,6	Mut7	3,04 x 10 ⁴ (863)	5,07 x 10 ⁻³ (9,89 x 10 ⁻⁵)	107,00	2,3
Mut8	2,72 x 10 ⁵ (3,64 x 10 ³)	4,33 x 10 ⁻³ (1,09x 10 ⁻⁴)	15,90	2,6	Mut8	nbd	nbd	nbd	nbd
Mut9	nbd	nbd	nbd	nbd	Mut9	nbd	nbd	nbd	nbd
Mut10	3,00 x 10 ⁵ (3,59 x 10 ³)	6,12 x 10 ⁻⁴ (1,04 x 10 ⁻⁵)	2,04	18,9	Mut10	4,81 x 10 ⁵ (6,77 x 10 ³)	5,58 x 10 ⁻³ (6,75 x 10 ⁻⁵)	11,60	2,1
Mut11	8,41 x 10 ⁴ (1,25 x 10 ³)	6,19 x 10 ⁻⁴ (2,12 x 10 ⁻⁵)	7,02	18,7	Mut11	6,09 x 10 ⁵ (1,04 x 10 ⁴)	8,25 x 10 ⁻³ (8,20 x 10 ⁻⁵)	13,50	1,4
Mut12	1,25 x 10 ⁵ (815)	8,58 x 10 ⁻⁴ (1,44 x 10 ⁻⁵)	6,99	13,5	Mut12	4,88 x 10 ⁴ (590)	2,01 x 10 ⁻³ (3,14 x 10 ⁻⁵)	41,10	5,7
Mut13	2,38 x 10 ⁵ (2,70 x 10 ³)	1,33 x 10 ⁻³ (2,21 x 10 ⁻⁵)	5,58	8,7	Mut13	5,08 x 10 ⁵ (1,51 x 10 ³)	1,13 x 10 ⁻³ (9,23 x 10 ⁻⁵)	2,22	10,2
Mut14	3,22x10 ⁵ (4,62 x 10 ³)	4,60 x 10 ⁻³ (1,51 x 10 ⁻⁴)	14,30	2,5	Mut14	1,15 x 10 ⁵ (4,17 x 10 ³)	0,0312 (8,15 x 10 ⁻⁴)	271,00	0,4

Figura 24. Afinidades por TNF α y LT α humanos y murinos de CrmD y los mutantes en el dominio de unión al TNF de CrmD. Se generaron *chips* CM4 acoplados con menos de 600 RUs de cada proteína y se inyectaron sobre ellos distintas concentraciones de las citoquinas. Los sensorgramas se analizaron y ajustaron según un modelo global de Langmuir 1:1 con el programa informático Biaevaluation 3.2. Se indican las constantes de asociación (Ka), de disociación (Kd) y de afinidad (KD), junto con los errores estándar (EE) y la vida media de cada interacción. nbd: union no detectada.

Se ha propuesto que el TNF α y la LT α son unidos de manera similar por TNFR1 y TNFR2, sin embargo, existen pequeñas variaciones importantes (Mukai y cols., 2010). En nuestras condiciones, los mutantes de CrmD se comportaron de manera similar tanto frente al TNF α como frente a la LT α . No se encontró ningún mutante que uniese perfectamente una de estas citoquinas y fuese inactivo frente a la otra. Esto sugiere que el TNF α y la LT α comparten, en su interacción con CrmD, residuos importantes. Sin embargo,

el Mut5, Mut7 y Mut14 que unen mTNF α con la misma afinidad que CrmD, presentan una reducción de un orden de magnitud en la afinidad por mLT α (Figura 24), lo que está de acuerdo con la existencia de pequeños reajustes en la unión de una y otra citoquina.

El Mut7 y el Mut14 afectan a la secuencia del CRD3 (Figura 22A), el dominio responsable de la especificidad de la interacción. Y de acuerdo con esto, estos mutantes mantuvieron sus propiedades anti-TNF intactas mientras que presentaron menor afinidad por LT α que CrmD (Figura 24). A este respecto, mucho más destacable es la actividad que presentó el Mut13, también en el CRD3. Este mutante, en el que un motivo EFE fue cambiado por AAA (Figura 22A), presentó un aumento en la afinidad por hLT α de un orden de magnitud (K_D = 2,22 nM) respecto a CrmD (K_D = 50,40 nM). Este mejora en la afinidad del Mut13 se debió principalmente a un incremento en un orden de magnitud de la K_a respecto a la proteína parental, sugiriendo que el motivo EFE de CrmD entorpece la formación rápida de contactos con el ligando.

Por lo tanto, las mutaciones en el CRD2 de CrmD afectaron principalmente a la afinidad de las interacciones mientras que, cambios en el CRD3 tuvieron efectos sobre la especificidad, como en el caso del Mut13 que presentó una ganancia de afinidad por hLT α , manteniendo sus propiedades anti-mLT α . Estos resultados están de acuerdo con la función atribuida al CRD2 y CRD3 en la interacción con el ligando en otros TNFRs.

4.2.4 Análisis de la actividad anti-TNFSFLs de los mutantes de CrmD

Se realizaron cuatro ensayos de citotoxicidad en células L929 independientes, en los que se preincubaron, a relaciones molares creciente, los distintos mutantes con hTNF α , mTNF α , mLT α y hLT α (Figura 25). En la mayor parte de los casos se pudo correlacionar una afinidad alta con una mejor capacidad de inhibir los efectos de la citoquina correspondiente *in vitro*. Así, mutantes para los que mediante SPR no se detectó unión para cierta citoquina, no inhibieron su citotoxicidad en grado alguno. Por ejemplo, las proteínas Mut4, Mut6 y Mut9, que no interaccionaron con ningún TNFSFL probado por SPR (Figura 24), no protegieron de sus efectos citotóxicos en ningún caso (Figura 25).

Como se puede observar en la Figura 25, los mutantes generados en el CRD1 para evaluar la posible existencia de un dominio PLAD en la secuencia de CrmD, Mut1 y Mut8, fueron capaces de bloquear la citotoxicidad mediada por las distintas citoquinas. La actividad del Mut1 no se diferenció de la de la proteína parental, mientras que el Mut8 necesitó mayores concentraciones para alcanzar los niveles de protección observados con CrmD. Todo ello está de acuerdo con las afinidades calculadas para estas proteínas por los correspondientes TNFSFLs ensayados. Esto sugiere que la actividad biológica de CrmD es independiente de la existencia de un dominio PLAD.

CrmD fue capaz de bloquear eficientemente la mLT α , sin embargo, no se detectó ningún efecto protector de la actividad de la hLT α *in vitro* (Figura 25D). Por lo tanto, CrmD une hLT α pero no lo hace de manera tal que pueda competir eficazmente su unión al receptor celular. Sólo el Mut13, que manifestó una mayor afinidad por esta citoquina que la proteína parental (Figura 24), inhibió eficientemente y de manera dosis dependiente, la citotoxicidad inducida por hLT α .

Por lo general y como se muestra en la Figura 24, las mutaciones realizadas afectaron más drásticamente a la unión de los ligandos humanos. Por ejemplo, los mutantes del Mut3 al Mut9 presentaron una pérdida significativa de la actividad anti-hTNF α de CrmD (Figura 24B) mientras que, las proteínas Mut5, Mut7 y Mut8 inhibieron la citotoxicidad mediada por el mTNF α de manera comparable a la proteína parental (Figura 25A). Esto sugiere que la proteína CrmD, proteína expresada por un virus estrictamente de ratón, está mejor adaptada para el bloqueo de los ligandos murinos.

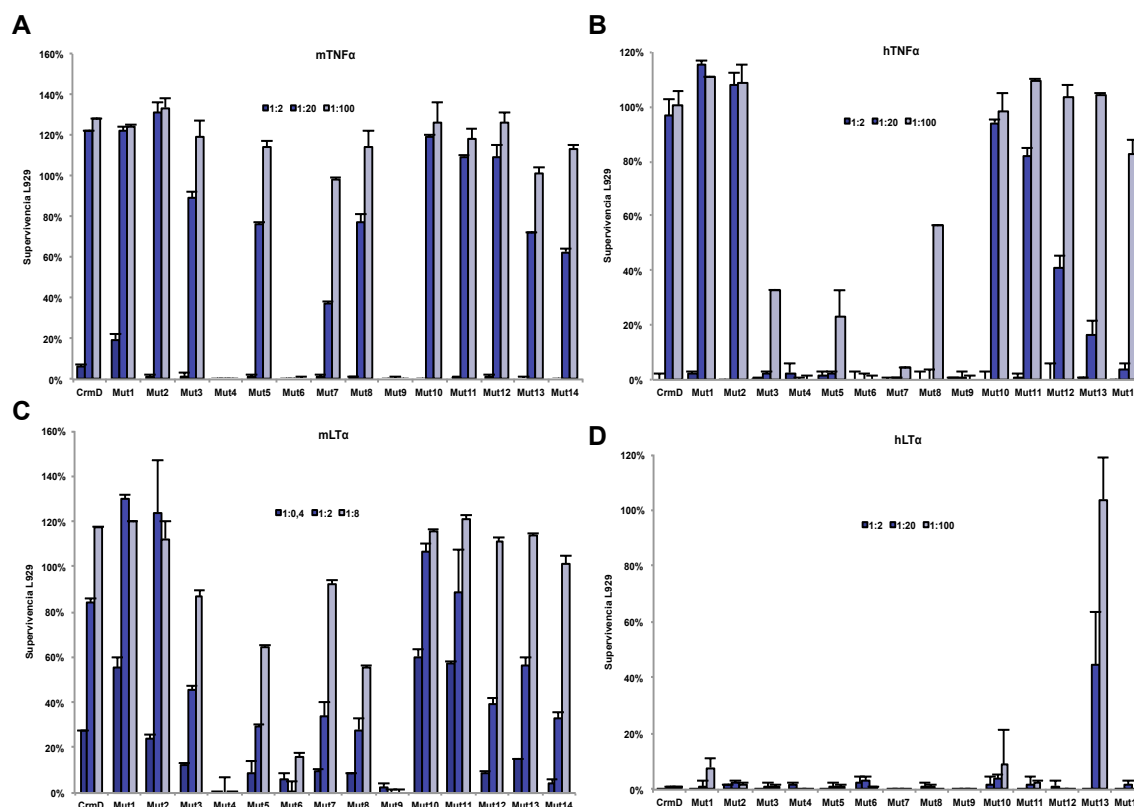


Figura 25. Actividad biológica de los mutantes de CrmD frente a TNF α y LT α , humanas y murinas. Se llevaron a cabo experimento de citotoxicidad en células L929 para testar la actividad de los mutantes de CrmD *in vitro*. Las proteínas recombinantes se incubaron a las relaciones molares indicadas, con 1,2 nM de mTNF α (A), hTNF α (B) y hLT α (C) y con 40 nM de mLT α (D). Se muestra el valor medio de triplicados junto con la desviación estándar.

4.2.5 CrmD modula la actividad del tmTNF α

4.2.5.1 CrmD inhibe la citotoxicidad mediada por el tmTNF α

El TNF α es primeramente expresado en la membrana celular como un trómero de una proteína de 26 kDa (Tang y cols., 1996). Este TNF α transmembrana (tmTNF α) es posteriormente procesado por la enzima convertora del TNF (TACE) y como resultado se libera un homotrómero de TNF α soluble (sTNF α) de 17 kDa (Black y cols., 1997). Sin embargo, el tmTNF α , no es un mero precursor, sino que desempeña funciones importantes en la respuesta inmunológica innata.

Con el fin de determinar si CrmD, que como ya se ha mostrado inhibe la actividad del sTNF α , era capaz de bloquear la actividad del tmTNF α , se realizó un experimento de citotoxicidad inducido por tmTNF α , expresado en células RAW 264.7 tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Brevemente, las proteínas CrmD y CrmD163, junto con un anticuerpo neutralizante del TNF α y el receptor soluble hTNFR2Fc, se incubaron, a 5 μ g/ml, con células efectoras RAW 264.7 en reposo (-LPS) o estimuladas con 500 ng/ml de LPS durante 6h para la expresión de tmTNF α (+LPS). Posteriormente, se fijaron las células mediante paraformaldehído, se lavaron para retirar el posible sTNF α y se añadieron sobre células diana L929 a una relación 5:1 (efector:diana). Como se puede ver en la Figura 26, las células RAW 264.7 no estimuladas (-LPS), no provocaron ningún efecto citotóxico sobre las células L929. Sin embargo, en presencia de células previamente activadas (+LPS) e incubadas en ausencia de inhibidores, la supervivencia de las células L929 fue nula. Por otro lado, cuando las células RAW 264.7 estimuladas se preincubaron con CrmD o hTNFR2, la supervivencia de las células L929 fue cercana al 100% (Figura 26). Una protección similar se logró al preincubar las células con un anticuerpo anti-mTNF α (Figura 26), lo que demuestra que el efecto citotóxico que se midió en este ensayo era específico del tmTNF α . Como era de esperar, puesto que carece del dominio

de unión al TNF de CrmD, la proteína CrmD163 no inhibió la citotoxicidad mediada por el tmTNF α . Estos resultados en su conjunto demuestran que CrmD es un inhibidor del TNF α capaz de interactuar y bloquear la actividad, no sólo del sTNF α , sino también del tmTNF α .

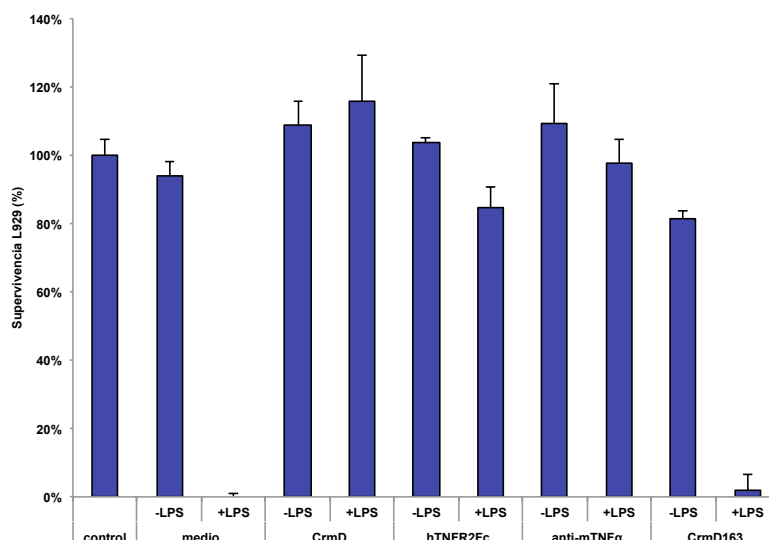


Figura 26. CrmD inhibe la citotoxicidad mediada por el tmTNF α . Ensayo de citotoxicidad inducida por tmTNF α expresado en la superficie de células RAW 264.7 activadas con 500ng/ml de LPS. Tras la estimulación con LPS, las células RAW 264.7 se fijaron e incubaron con 5 μ g/ml de las proteínas CrmD, CrmD163 y hTNFR2 y un anticuerpo anti-mTNF α . Se muestra la supervivencia media y la desviación estándar de células L929 incubadas en ausencia (control) o presencia de células RAW 264.7 activadas (+LPS) o no (-LPS), previamente incubadas con las proteínas recombinantes indicadas o sin inhibidores (medio).

4.2.5.2 Los mutantes de CrmD presentan una actividad frente al tmTNF α comparable a la mostrada frente al sTNF α

A pesar de sus similitudes, se ha propuesto que el tmTNF α y el sTNF α presentan diferencias importantes en su conformación tridimensional (Horiuchi y cols., 2010). De hecho, el tmTNF α pone en marcha sus funciones biológicas preferencialmente tras su interacción con el TNFR2 mientras que el sTNF α es el principal ligando del TNFR1 (Grell, 1995). Mediante análisis por mutagénesis se ha demostrado que algunos residuos importantes del ligando para la interacción sTNF α -TNFR, no están implicados en la unión del tmTNF α y viceversa. Por ejemplo, Zheng y cols. encontraron que el mutante del tmTNF α D143Y carecía de actividad citotóxica mientras que el producto tras el procesamiento por TACE era completamente activo (Zheng y cols., 2009).

Para comprender si los mutantes de CrmD presentaban un efecto anti-tmTNF α similar al observado frente a sTNF α , se llevó a cabo un experimento de citotoxicidad con tmTNF α . Cuando las células RAW264.7 se preincubaron con CrmD, se observó una supervivencia cercana al 100% al añadir 0,25 μ g/ml de proteína recombinante (Figura 27). Por su parte, la actividad anti-tmTNF α de los distintos mutantes de CrmD fue similar a la anti-sTNF α . Se debe tener en cuenta que al ser las células RAW264.7 una línea de ratón se ha trabajado con un tmTNF α murino. Así, mutantes incapaces de inhibir la citotoxicidad mediada por el mTNF α , como el Mut4, el Mut6 y el Mut9 (Figura 25A), tampoco interfirieron en la muerte celular inducida por la forma transmembrana de esta citoquina (Figura 27). Y el resto de mutantes que inhibieron la actividad del mTNF α soluble (Figura 25A) también bloquearon la citotoxicidad inducida por el tmTNF α (Figura 27).

De estos experimentos podemos concluir, primero, que CrmD es un vTNFR soluble que puede interactuar con tmTNF α e inhibir sus efectos biológicos y que lo hace además, siguiendo estrategias moleculares similares a las empleadas para unir el sTNF α .

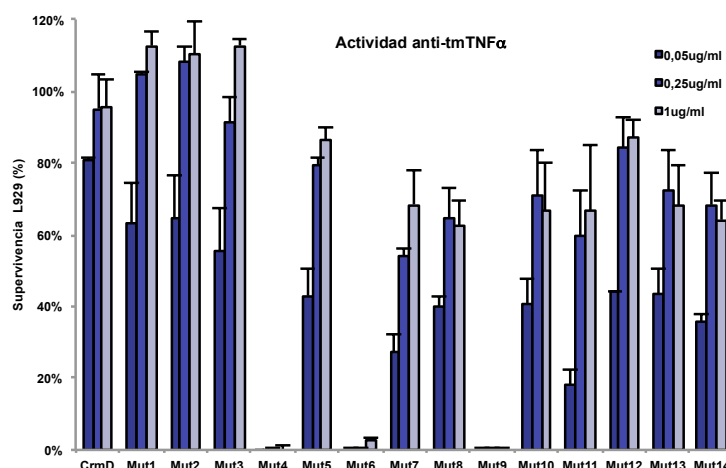


Figura 27. Inhibición del efecto citotóxico inducido por el $\text{tmTNF}\alpha$ por CrmD y sus mutantes. Supervivencia (%) de células L929 en presencia de células RAW264.7 estimuladas con LPS y posteriormente preincubadas con cantidades crecientes (0,05, 0,25 y 1 $\mu\text{g/ml}$) de CrmD y los mutantes (Mut1-14). Se muestran la medias y las desviaciones estándar de la supervivencia celular analizada por triplicado.

4.2.5.3 La interacción de CrmD con el $\text{tmTNF}\alpha$ reduce la producción de sTNF

Además de los efectos como ligando del $\text{tmTNF}\alpha$, su interacción con los receptores celulares puede inducir señalización reversa en la célula que expresa el $\text{tmTNF}\alpha$. Por ejemplo, se ha demostrado que la incubación de células NK-92 con TNFR1 induce la producción de $\text{sTNF}\alpha$ aumentando la citotoxicidad de esta línea celular (Yu y cols., 2009). De manera similar, la preestimulación del $\text{tmTNF}\alpha$ mediante un TNFR1 soluble, sensibiliza a la línea celular de monocitos humanos, U937, para la activación mediada por el $\text{sTNF}\alpha$ (Rossol y cols., 2007).

Se ha demostrado que CrmD es capaz de bloquear los efectos citotóxicos del $\text{tmTNF}\alpha$ sobre células L929. La siguiente pregunta fue si esta interacción de CrmD con el $\text{tmTNF}\alpha$, podía inducir señalización reversa. Para ello, se llevó a cabo un experimento en el que células RAW 264.7 fueron incubadas con concentraciones crecientes de CrmD, mTNFR1Fc y hTNFR2Fc . Como control se añadió la proteína CrmD163 que carece del dominio de unión al $\text{TNF}\alpha$ de CrmD y no interfiere con los efectos *in vitro* de esta citoquina (Figura 21A). Tras 30 min a 37°C, se lavaron las células profusamente para retirar del sobrenadante los restos de proteína recombinante. Se incubaron las células con medio fresco y 2h después de los lavados se analizaron por triplicado, 5 μl del sobrenadante de cada muestra, para la presencia de $\text{sTNF}\alpha$, utilizando un *kit* de ELISA.

Como se observa en la figura 28, las células RAW 264.7 no estimuladas (medio) produjeron un nivel basal de $\text{sTNF}\alpha$ cercano a los 150 pg/ml. Sin embargo, cuando las células se preincubaron con mTNFR1Fc , la liberación al sobrenadante de $\text{sTNF}\alpha$ se disparó hasta casi 1.200pg/ml. Esta estimulación está de acuerdo con el efecto descrito del TNFR1 sobre células NK-92 (Yu y cols., 2009). Por otro lado, esta inducción no se observó cuando las células fueron incubadas con el hTNFR2Fc y como era de esperar, la proteína CrmD163 tampoco tuvo ningún efecto sobre la producción de $\text{sTNF}\alpha$ (Figura 28). Por el contrario, la preincubación de las células RAW 264.7 con 10 $\mu\text{g/ml}$ de CrmD, redujo significativamente los niveles de $\text{sTNF}\alpha$ en el sobrenadante (50 pg/ml) (Figura 28).

Estos resultados sugieren que la interacción de CrmD con el $\text{tmTNF}\alpha$, puede inducir señalización reversa inhibiendo la producción de $\text{TNF}\alpha$. Por lo tanto, éste podría ser otro mecanismo por el que CrmD mediasiase sus efectos anti- $\text{TNF}\alpha$ *in vivo*.

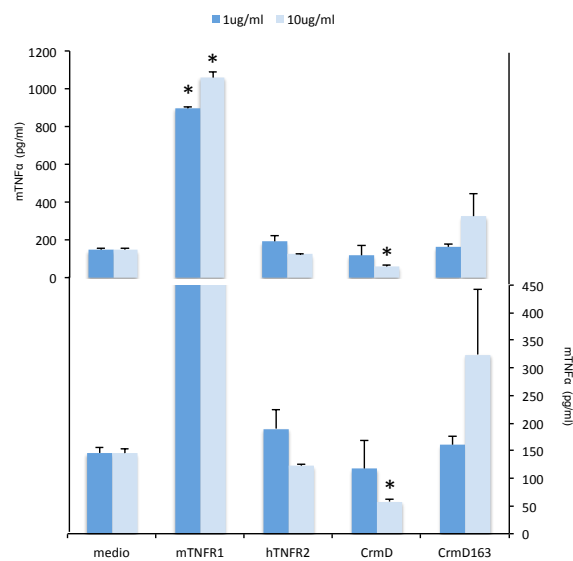


Figura 28. CrmD inhibe la producción de sTNF α en células RAW 264.7. Células RAW 264.7, sembradas el día a una densidad de 120.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos, fueron incubadas durante 30 min con 1 y 10 μ g/ml de las proteínas recombinantes, mTNFR1Fc, hTNFR2Fc, CrmD y CrmD163. Posteriormente, se lavaron las células y se incubaron en medio fresco durante 2h adicionales. Se analizó, por triplicado, la presencia de sTNF α en 5 μ l de cada sobrenadante mediante el *kit* de ELISA mTNF α Ready-SET-go. Se muestran la concentración media de sTNF α (pg/ml) y su desviación estándar, detectada para cada muestra. Se representan los datos en dos escalas distintas indicadas en los dos ejes de ordenadas.

4.3 Estudio de las propiedades de los distintos vTNFRs expresados por poxvirus.

Se han descrito cuatro vTNFRs distintos, CrmB (Hu y cols., 1994), CrmC (Smith y cols., 1996), CrmD (Loparev y cols., 1998) y CrmE (Saraiva y Alcamí, 2001). La mayoría de los poxvirus presentan al menos un gen que codifique por alguna de estas proteínas, lo que resalta la importancia del TNF α en la defensa antiviral. La expresión de estos vTNFRs se produce de manera diferencial entre los distintos miembros de la familia *Poxviridae*. Algunas cepas de CPXV, un virus con un amplio rango de hospedador (roedores, ganado, primates), como el CPXV_GRI-90, contienen en sus genomas los genes para la expresión de estos cuatro inhibidores del TNF α . En cambio, virus con hospedadores más restringidos como VARV o ECTV, sólo expresan uno de estos vTNFRs. CrmB en el caso de VARV y CrmD en el de ECTV (Tabla 1).

Con el fin de investigar si estos vTNFRs presentan propiedades únicas que los conviertan en mejores inmunomoduladores según el hospedador que infecte el virus que los expresa, se han analizado las diferencias de afinidad y especificidad frente a distintos TNFSFLs de 6 de estos receptores, CrmB_VARV, CrmB_CPXV, CrmC_CPXV, CrmE_CPXV, CrmD_ECTV y CrmD_CPXV.

4.3.1 Clonaje y expresión de vTNFRs

Los genes correspondientes a CrmB de VARV cepa Bangladesh 1975 y CPXV cepa Brighton Red, CrmD de ECTV cepa Naval y CPXV cepa Brighton Red, CrmC de CPXV cepa Brighton Red y CrmE de CPXV cepa Elephantpox, cuyas secuencias alineadas se pueden ver en la Figura 29A, fueron clonados en el vector pFastBac1 para su expresión mediante baculovirus recombinantes.

La estrategia de clonaje fue similar en todos los casos. Brevemente, se diseñó una pareja de oligonucleótidos (Tabla 4) para cada construcción de tal manera que tomando como molde plásmidos existentes en el laboratorio, se pudiese extraer el gen introduciendo en los extremos 5' y 3' las dianas BamHI y XhoI, respectivamente. Los genes se clonaron después en el vector pFastBac1 previamente digerido con BamHI y XhoI para su posterior transformación en bacterias DH10Bac, obteniendo así el báculo que se transfirió en células de insecto *Sf9* para la generación del correspondiente baculovirus recombinante que expresara la proteína de interés.

Para la expresión y purificación de cada proteína se procedió como se ha explicado en Materiales y Métodos para otros casos. Gracias al *tag* 6xHis en el extremo C-terminal de las proteínas, éstas se pudieron purificar mediante cromatografía de afinidad en resina de níquel Ni-NTA. Las fracciones de imidazol ricas en proteína se juntaron, se dializaron en PBS y se concentraron para después calcular la concentración de cada stock mediante BCA y densitometría. Mediante SDS-PAGE se evaluó el grado de pureza de cada purificación (Figura 29B). Se obtuvieron *stocks* cercanos al 95% de pureza (Figura 29B) que se almacenaron a -20°C en alícuotas de un único uso a una concentración de 1 mg/ml. En el gel de la Figura 29B se muestran las proteínas purificadas.

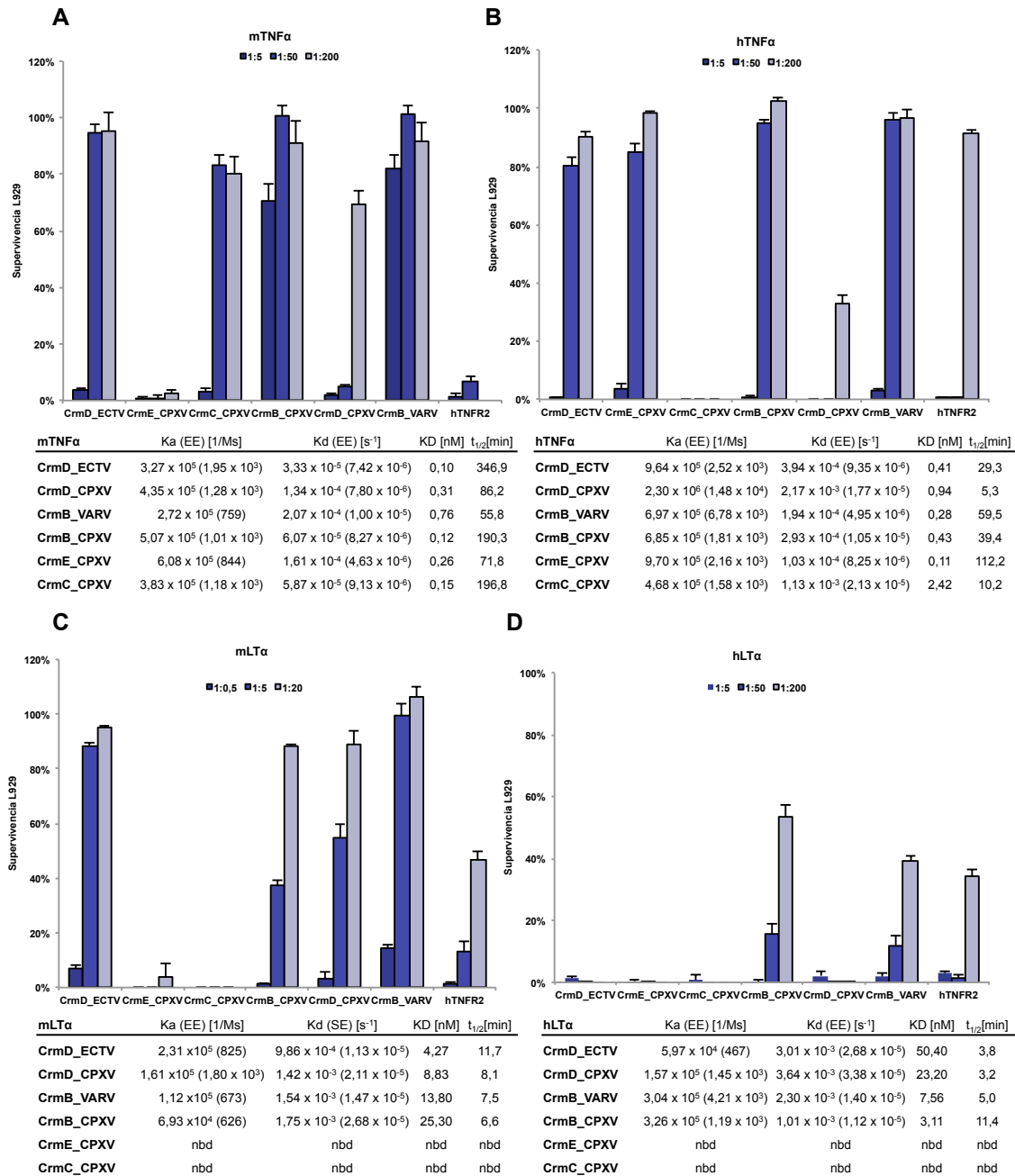


Figura 30. Actividad frente al TNF α y LT α de origen humano (h) y murino (m) de los vTNFRs. Se incubaron relaciones molares crecientes de los 6 vTNFRs: CrmD_ECTV, CrmE_CPXV, CrmC_CPXV, CrmB_CPXV, CrmD_CPXV y CrmB_VARV (1:5, 1:50 y 1:200), con 1,2 nM de mTNF α (A), hTNF α (B) y hLT α (D) y 40 nM de mLT α (C). Como control, se añadió a las mismas concentraciones, hTNFR2 expresado mediante un baculovirus recombinante. Se muestran las medias y las desviaciones estándar de la supervivencia de células L929 (%) en cada muestra en relación a la absorbancia medida en las muestras sin citoquina. Las tablas que acompañan a las gráficas muestran las constantes de asociación (Ka), disociación (Kd) y de afinidad (KD) junto con el error estándar (EE) de las constantes y el tiempo de vida media (t_{1/2}) de cada interacción. Todos los sensorgramas se ajustaron a un modelo global de Langmuir 1:1. nbd=unión no detectada.

Por otra parte, no se encontraron diferencias entre los distintos CrmB de CPXV y de VARV, pero sí que se observó que el CrmD_ECTV y CrmD_CPXV tenían distintas propiedades. Al menos en lo que se refiere al TNF α , mientras que CrmD_ECTV protegió del efecto citotóxico de la citoquina, CrmD_CPXV presentó una capacidad muy reducida de bloquear la citotoxicidad mediada tanto por el ligando humano como el murino, protegiendo, en su mayor concentración testada (relación 1:200), sólo al 70 y el 30% de las células tratadas con mTNF α y hTNF α , respectivamente (Figura 30A y B). Sin embargo, para la mLT α , ambos, CrmD_ECTV y CrmD_CPXV, inhibieron de manera equivalente sus efectos (Figura 30C).

Como se esperaba por los datos previos existentes en la bibliografía, CrmE y CrmC únicamente inhibieron TNF α , no detectándose unión de LT α mediante SPR (Figura 30C y D). Sin embargo, existieron diferencias en la especificidad de estos dos vTNFRs, aunque ambos son expresados por CPXV, un virus de amplio rango de hospedador. Mientras que CrmE se comportó como un mejor inhibidor de hTNF α , CrmC fue más efectivo bloqueando mTNF α de ratón (Figura 30A y B). Un exceso molar de 200 veces respecto a la citoquina (1,2 nM) de CrmE o CrmC no mostraron ningún signo de protección frente al mTNF α ni al hTNF α , respectivamente.

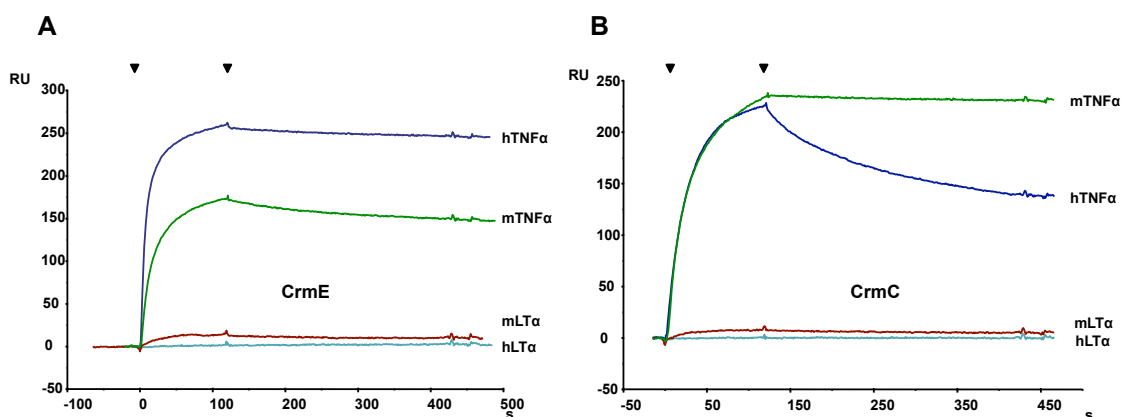


Figura 31. CrmC y CrmE unen específicamente TNF α . Unión por SPR de mTNF α (verde), hTNF α (azul), mLT α (rojo) y hLT α (gris) a *chips* CM4 acoplados con 200 ng de CrmE_CPXV (A) y CrmC_CPXV (B). Se muestran los sensorgramas recogidos para las cuatro citoquinas inyectadas a 100nM en HBS-EP, a 10 μ l/min. Con triángulos invertidos se indica el inicio y el fin de la inyección.

En el caso de CrmC esta especificidad se manifestó igualmente en las afinidades por hTNF α y mTNF α . Aunque ambos se unieron rápidamente a CrmC, el hTNF α se disoció significativamente más rápido que el mTNF α (Figura 31B). Así, se encontró una diferencia de un orden de magnitud en beneficio del ligando murino (hTNF α K_D = 2,42 nM, mTNF α K_D = 0,15 nM) (Figura 30A y B). Sin embargo, CrmE presentó afinidades muy altas y equivalentes por ambos TNF α (hTNF α K_D = 0,11 nM, mTNF α K_D =0,26nM) (Figura 30A y B). Como se puede ver en la Figura 31A, en el caso de CrmE, tanto el hTNF α como el mTNF α se asociaron y disociaron a la misma velocidad. Estos datos, junto con los datos de actividad *in vitro*, sugieren que a pesar de la alta afinidad de CrmE por mTNF α , esta interacción no es eficaz para la inhibición de la actividad del mTNF α , probablemente porque no bloquee residuos importantes del ligando en la interacción con su receptor celular.

Con el fin de confirmar las diferencias de especificidad entre CrmC y CrmE, se diseñó un ensayo de competición por SPR. En este experimento, se preincubaron cantidades crecientes de CrmC y CrmE con 50 nM de mTNF α y hTNF α para después inyectar la mezcla sobre un *chip* CM4 acoplado con el receptor celular mTNFR1 y recoger la respuesta en el equilibrio. Lo que se observó fue que, de nuevo, CrmC consiguió inhibir la unión del mTNF α a menores concentraciones que CrmE, mientras que CrmE fue más eficaz en el bloqueo de la unión del hTNF α (Figura 32). Mientras que para el mTNF α , CrmC y CrmE inhibieron el 50% de la unión de la citoquina al *chip*, a 40 nM y 160 nM, respectivamente, para el hTNF α fueron necesarios 60 nM de CrmE y más de 300 nM de CrmC (Figura 32). Así, CrmC y CrmE parecen ser dos moléculas diseñadas para inhibir el TNF α con propiedades de especificidad únicas que los convierten en mejores receptores del mTNF α o el hTNF α , respectivamente.

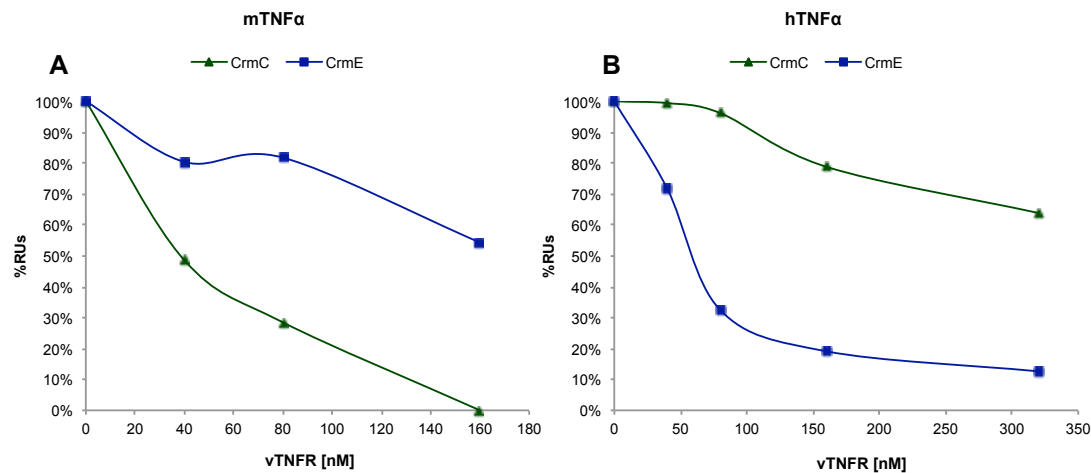


Figura 32. CrmC y CrmE bloquean de manera específica la unión a mTNFR1 de mTNFα y hTNFα, respectivamente. Ensayos de competencia de la unión de mTNFα (A) y hTNFα (B) a un chip CM4 acoplado con 200 ng de mTNFR1. Se incubaron cantidades crecientes de CrmE (azul) y CrmC (verde) con 50 nM de citoquina en HBS-EP durante 15 minutos en hielo. Tras ese tiempo las mezclas se inyectaron a 10 µl/min sobre un chip acoplado con 2.000 RUs del receptor celular murino de TNF, mTNFR1 y se recogieron las respuestas en el equilibrio. Los datos se representan en porcentaje respecto a la unión máxima recogida en ausencia de inhibidor.

Así, estos experimentos, pusieron de manifiesto, no sólo las diferencias de afinidad entre los vTNFRs, sino también la adaptación de la especificidad de estos receptores a sus ligandos según fueran humanos o de ratón. Así, CrmD_ECTV, expresado por un virus estrictamente de ratón, inhibió más eficazmente la actividad biológica de las citoquinas murinas, mientras que CrmB_VARV bloqueó con mayor eficacia las versiones humanas, especialmente en el caso de la LTα. Por otro lado, se ha demostrado que vTNFRs expresados por un mismo virus, CPXV, presentan diferencias en la especificidad de sus ligandos. Así, CrmE y CrmC se mostraron como inhibidores específicos de hTNFα y mTNFα, respectivamente, pero CPXV cuenta también con CrmB y CrmD para el bloqueo de la LTα. Teniendo CrmB mejor afinidad por la forma humana y CrmD por la de ratón.

4.3.3 Actividad anti-tmTNFα de vTNFRs

Al igual que con los mutantes de CrmD, se comprobó si existían diferencias entre los vTNFRs a la hora de bloquear la actividad citotóxica del tmTNFα murino o si éstos se comportaban de igual manera a como lo hacen frente al sTNFα. Se incubaron cantidades crecientes de proteína recombinante con células RAW 264.7 fijadas y previamente estimuladas con LPS para la expresión de TNFα. Después, se añadieron sobre células L929 a una relación efector:diana de 5:1 y se midió la viabilidad celular 16h después. En el experimento, se incorporó como control negativo el Mut4 que no inhibe el tmTNFα (Figura 27).

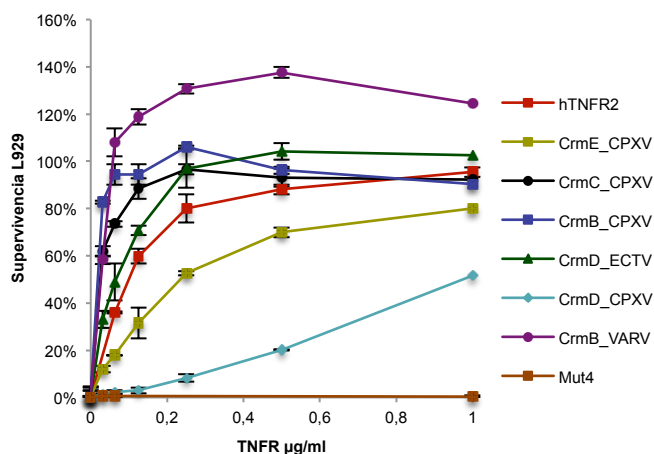


Figura 33. Los vTNFRs Inhiben de la citotoxicidad inducida por tmTNFα. Se incubaron concentraciones crecientes (0-1 µg/ml) de los vTNFRs indicados con células RAW264.7 estimuladas con LPS y posteriormente se añadieron sobre células L929. Se determinó la supervivencia (%) en relación a la viabilidad de células L929 en presencia de células RAW264.7 no estimuladas. Se representan las medias y desviaciones estándar de la supervivencia celular, analizada por triplicado, para cada muestra: hTNFR2 (rojo), CrmE_CPXV (amarillo), CrmC_CPXV (negro), CrmB_CPXV (azul oscuro), CrmD_ECTV (verde), CrmD_CPXV (azul claro), CrmB_VARV (morado) y Mut4 (naranja).

Se observó, un comportamiento similar al obtenido con sTNF α de ratón, con una importante salvedad. CrmD_CPXV al igual que con la forma soluble del mTNF α , necesitó altas concentraciones (1 μ g/ml) para poder llegar a proteger al 50% de las células. Sorprendentemente, CrmE_CPXV, que en las condiciones ensayadas anteriormente no bloqueó el mTNF α soluble (Figura 30A), mostró una capacidad equiparable al resto de vTNFRs de inhibir el tmTNF α (Figura 33), llegando a ser incluso más eficaz que CrmD_CPXV. Así, la interacción CrmE-tmTNF α puede estar ocurriendo de una manera tal que inhiba eficientemente la unión de la citoquina a su receptor, algo que no sucede cuando CrmE une sTNF α .

Otros vTNFRs, como CrmC_CPXV, CrmB_CPXV, CrmB_VARV y CrmD_ECTV, al igual que el receptor soluble hTNFR2, protegieron al 50% de las células L929, a concentraciones cercanas a 0,1 μ g/ml. El Mut4, como se esperaba, no mostró ningún signo de protección (Figura 33).

4.4 Estudio *in vivo* del papel de la proteína CrmD en la patogénesis del virus Ectromelia

ECTV es un virus de la familia de los poxvirus englobado en el género *Orthopoxvirus*. Se trata del agente causal de *mousepox*, una enfermedad de ratón que constituye uno de los mejores modelos para el estudio de la patogénesis de una infección viral y especialmente de la viruela humana. Al igual que el ser humano para VARV, el ratón es el único hospedador que ECTV es capaz de infectar eficazmente, con lo que deben ser dos virus altamente adaptados a cada uno de sus hospedadores.

ECTV y VARV han desarrollado estrategias similares de evasión del sistema inmune del hospedador. Sin embargo, en cuanto a lo que inhibidores del TNF se refiere, como se ha mostrado en apartados anteriores, ambos expresan un vTNFR, CrmD y CrmB, respectivamente que unen también un pequeño grupo de CKs murinas y humanas. Además de alguna pequeña diferencia de los ligandos quimiotácticos del dominio SECRET de estas dos proteínas, CrmD está mejor diseñado para la inhibición de TNFSFLs de origen murino, sobre todo en lo que se refiere a la LT α (Apartados 1 y 3 de *Resultados*).

En el laboratorio ya existían datos previos que sugerían que CrmD era un factor de virulencia esencial en la patogénesis de ECTV (Ruiz-Arguello y cols., 2012). Los datos obtenidos demostraron que el virus de delección de este gen (ECTV Δ CrmD) experimenta un incremento de 6 órdenes de magnitud en su DL₅₀. Sorprendentemente, el virus revertiente que codificaba sólo para la región de unión a TNF de CrmD (ECTV RevCRDs) es también un virus altamente atenuado con una diferencia de 5 órdenes de magnitud en la DL₅₀ respecto al virus parental (ECTV RevCrmD). Es decir, la inhibición del TNF por CrmD no parecía tan esencial en la patogénesis. Por el contrario, el dominio SECRET y por tanto el bloqueo de CKs, juegan un papel muy importante en esta infección. Sin embargo, en el genoma de ECTV existen otros genes con capacidad para unir CKs (*EVM1*, *E163*, *SCP2* y *SCP3*) que no parecen compensar la ausencia del dominio SECRET de CrmD. Así que era fundamental generar el virus ECTV que expresase sólo el dominio SECRET (ECTV RevSECRET), para estudiar estas hipótesis de manera directa. Para la obtención de este virus, se generó un virus ECTV que expresa el mutante puntual Mut4 de CrmD, el cual conserva la capacidad anti-CK pero es incapaz de unir TNF. De ahora en adelante este nuevo virus se citará como ECTV RevSECRET.

4.4.1 Generación de ECTV RevSECRET

Los protocolos utilizados en el laboratorio para generar ECTV recombinantes exigen clonar en el plásmido pMS30 el gen de interés. En este plásmido, el gen es clonado acompañado de sus regiones flanqueantes 5' y 3' del genoma del virus y que constituyen las zonas por donde ocurrirá la recombinación. El protocolo detallado se explica en *Materiales y Métodos*. El objetivo fue obtener un virus con la mutación puntual N57F en la proteína CrmD, que como ya se ha demostrado, abole la unión de la proteína a los TNFSFLs pero mantiene las propiedades anti-CK del dominio SECRET. A partir del plásmido pMS37, que contiene el gen parental de CrmD y que en el pasado se había utilizado para generar el virus revertiente control de la delección de CrmD (ECTV RevCrmD), se obtuvo el Mut4 de CrmD, introduciendo el cambio N57F con la misma pareja de oligonucleótidos empleados para la mutagénesis dirigida del plásmido pSP3. La construcción resultante se denominó pSP21.

El plásmido pSP21 fue transfectado en células BS-C-1 previamente infectadas a baja moi con ECTV Δ CrmD (Figura 34 A1). A los tres días postinfección, o cuando se observó un efecto citopático total, se recogió el sedimento de células que tras tres pasos de congelación-descongelación-sonicación, que se utilizó para infectar células y llevar a cabo pases en puomicina. Estas rondas en un medio selectivo tuvieron la finalidad de enriquecer la muestra en el virus recombinante gracias al gen de resistencia a la puomicina contenido en pSP21 (Figura 34 A2). Para ello, las células BS-C-1 se infectaron con 1/4 del pase anterior y 5h después de la infección se añadió la puomicina. A los dos días, se recogió nuevamente el sedimento de células que fue utilizado como inóculo para el paso siguiente. Así, se dieron hasta cuatro pases en presencia de puomicina.

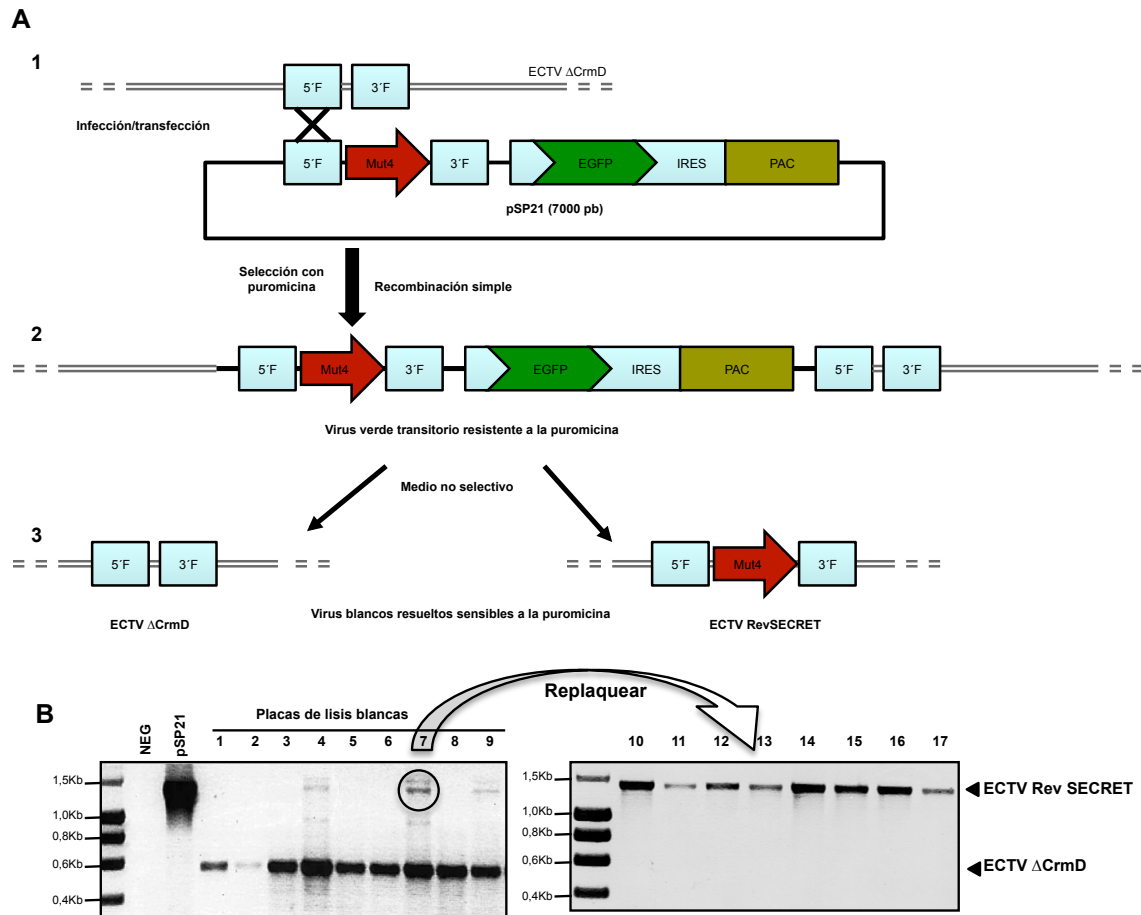


Figura 34. Generación de ECTV RevSECRET a partir del ECTV Δ CrmD y el Mut4 de CrmD. A) Representación esquemática de los pasos a seguir. 1. Infección de células BS-C-1 ($\text{moi}=0,01\text{-}0,1$ ufp/célula) con ECTV Δ CrmD y transfección con pSP21. 2. Selección de virus fluorescentes transitorios en medio selectivo con puromicina ($10\text{ }\mu\text{g/ml}$) y 3. Resolución de virus recombinantes (en medio no selectivo) hacia el virus de partida (ECTV Δ CrmD) o el virus recombinante de interés (ECTV RevSECRET). B) Geles de agarosa en los que se muestran los productos de PCR resultantes tras dos rondas de plaqueo. En medio no selectivo, se plaqueó una placa verde para la selección de placas de lisis blancas. Estas placas (1-9), se testaron mediante PCR con los oligonucleótidos CrmD27 y CrmD33. Se seleccionó una placa (7) positiva para el producto de mayor tamaño ($1,4\text{ kb}$) para una nueva ronda de plaqueo con la que purificar el virus ECTV RevSECRET. Se dieron sucesivas rondas de plaqueo hasta conseguir obtener placas de lisis blancas (10-17) puras para ECTV. RevSECRET. El tamaño de los fragmentos de DNA se indica en kb.

El último pase de puromicina fue plaqueado en células BS-C-1 para obtener placas de lisis verdes al microscopio de fluorescencia debido a la expresión de la proteína EGFP cuyo gen está presente en pSP21. Estas placas de lisis verdes, originadas por un virus resultado de una recombinación simple en la región flanqueante 5', se picaron y se utilizaron para una nueva ronda de plaqueo (Figura 34 A3). En este nuevo plaqueo se produce una recombinación en la región flanqueante 3', que resuelve el virus hacia la forma recombinante que se desea, dando como resultado placas de lisis no fluorescentes o blancas, pero positivas para el producto de PCR deseado. Así, se picaron varias placas de lisis blancas y se comprobó mediante PCR que, a diferencia de las placas de lisis del virus inicial, ECTV Δ CrmD ($0,6\text{ Kb}$), daban lugar a un producto correspondiente al tamaño del gen CrmD mutado ($1,4\text{ Kb}$). Una vez obtenida una placa de lisis positiva, se dieron otras tres rondas de plaqueo con el fin de purificar el virus recombinante de interés (Figura 34B).

Finalmente, el virus presente en la última placa de lisis se amplificó para generar un *master stock* con el que se infectaron células BS-C-1. De esta infección, se purificaron, mediante colchón de sacarosa, los *stocks* de trabajo de alto título que se almacenaron en Tris-HCl pH 9,0 a -80°C hasta ser utilizados en los experimentos *in vivo*.

4.4.2 Expresión y actividad de la proteína CrmD expresada por los distintos ECTV recombinantes

Antes de proceder a los experimentos con ratones se comprobó que cada virus recombinante de CrmD generado se comportaba según lo esperado. Para ello, se obtuvieron sobrenadantes de células BS-C-1 infectadas a alta moi (5 ufp/célula), con ECTV Δ CrmD, ECTV RevCrmD, ECTV RevCRDs y ECTV RevSECRET. Como control también se recogieron sobrenadantes de células no infectadas o *mock*. Estos sobrenadantes fueron primeramente concentrados y testados mediante un *western blot* revelado con un anticuerpo policlonal anti-CrmD para la expresión de proteína CrmD. Utilizando un anticuerpo frente a la proteína vCCI, una vCKBP secretada, como control, se pudo estimar que todos los virus expresaron cantidades de proteína equivalentes y que el virus ECTV Δ CrmD efectivamente no expresaba CrmD (Figura 35A).

Se realizó un experimento de citotoxicidad inducida por el mTNF α , en el que la citoquina se incubó con cantidades crecientes de sobrenadantes de células infectadas (volúmenes equivalentes a 0, 2, 8 y 16 x 10³ células BS-C-1). Los resultados demostraron que mientras que el sobrenadante de ECTV RevCrmD y ECTV RevCRDs tenían una capacidad similar de bloquear el mTNF α no existió ningún indicio de protección con los sobrenadantes de ECTV RevSECRET y ECTV Δ CrmD (Figura 35B). Estos datos confirmaron que el virus ECTV RevSECRET expresaba una versión de la proteína CrmD que no interactuó con el mTNF α .

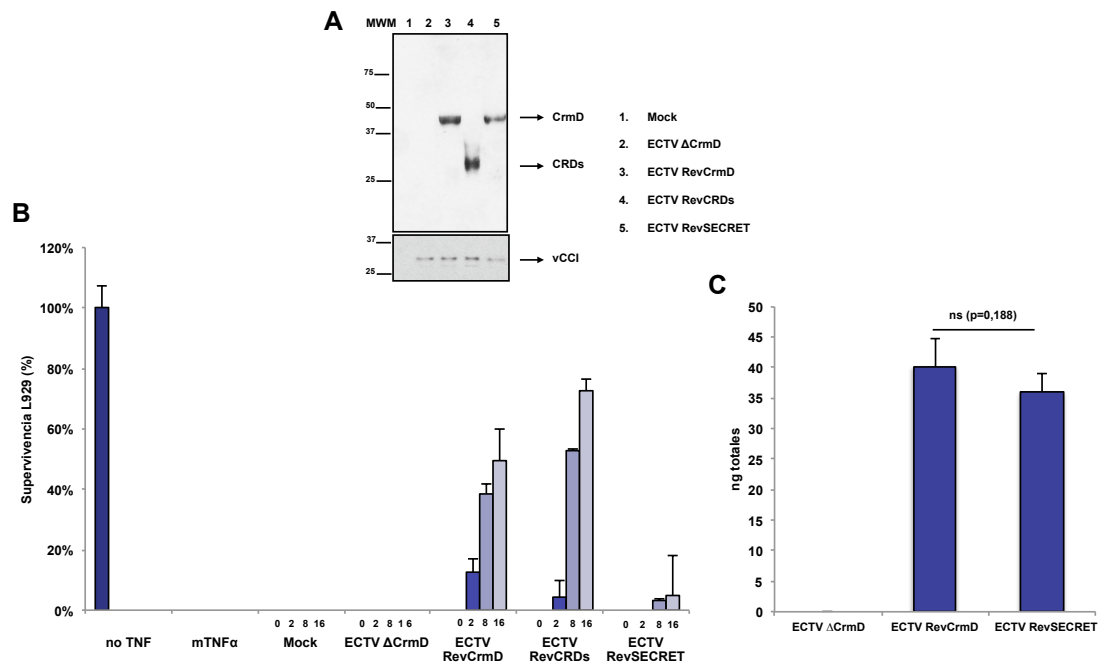


Figura 35. Los distintos virus ECTV recombinantes de CrmD expresan cantidades equivalentes de proteína. A) *Western blot* de los sobrenadantes de células BS-C-1 no infectadas (*mock*) o infectadas con los distintos ECTV a una moi de 5 ufp/célula. A las 24h tras la infección, se recogieron 10ml de cada sobrenadante que fueron concentrados hasta 150 μ l. Se sometieron a SDS-PAGE 5 μ l de cada sobrenadante y los *blots* fueron analizados con un anticuerpo de conejo anti-CrmD y un anti-vCCI como control. Se indica la posición de cada proteína con flechas negras. MWM: Marcadores de masa molecular en kDa B) Ensayo de citotoxicidad de mTNF α en células L929. El mTNF α de ratón fue incubado sobre células L929 en ausencia o presencia de volúmenes crecientes de sobrenadante (indicados como equivalente al número de células x 10³) de los sobrenadantes concentrados de los distintos ECTV recombinantes. Se indican las supervivencias medias y desviaciones estándar de triplicados tras restar a todas las muestras los valores obtenidos con sobrenadantes *mock*. C) Titulación mediante ELISA de la cantidad de proteína presente en los sobrenadantes concentrados. Se tapizaron placas de 96 pocillos con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-SECRET. Se utilizaron proteínas recombinantes purificadas CrmD y Mut4 para generar sendas curvas de calibración. Se analizaron por quintuplicado 2 μ l de cada sobrenadante incubados en PBS. Se muestra la cantidad total media y la desviación estándar para cada sobrenadante junto con el valor p, obtenido de un test T de Student, de la comparación estadística de los resultados de ECTV RevCrmD y ECTV RevSecret. (ns: no significativo).

Además, fue importante confirmar que ECTV RevSECRET expresaba una cantidad de proteína equivalente a la de los demás virus. Ante la imposibilidad de llevar a cabo un ensayo de migración ya que en el genoma de ECTV existen otras proteínas que bloquean cualquiera de las CKs inhibidas por el dominio SECRET de CrmD, se decidió hacer una cuantificación de la proteína presente en los sobrenadantes mediante ELISA tal y como se detalla en *Materiales y Métodos*. En este ensayo se usó como anticuerpo de captura un monoclonal de ratón que reconoce el dominio SECRET de CrmD y no reconoce a las proteínas relacionadas SCP2 y SCP3. Se analizaron los sobrenadantes de células infectadas con ECTV ΔCrmD, ECTV RevCrmD y ECTV RevSECRET. Se emplearon las proteínas recombinantes CrmD y Mut4 para generar las correspondientes curvas de calibración respecto a las cuales se calculó la cantidad total de proteína presente en el sobrenadante. Los resultados mostraron que ECTV RevCrmD y ECTV RevSECRET expresaban cantidades comparables de proteína (Figura 35C).

De esta manera, se confirmó que el nuevo virus ECTV RevSECRET no bloquea la actividad del mTNF α pero expresa una proteína con dominio SECRET, que es reconocida por un anticuerpo específico, en cantidades equivalentes a la expresión de CrmD por ECTV RevCrmD.

4.4.3 Ambos dominios de CrmD son esenciales en la patogénesis de Ectromelia

Con el fin de estudiar el papel de CrmD y cada uno de sus dominios en la patogénesis de *mousepox*, se infectaron distintos grupos de ratones susceptibles, BALB/c, por vía subcutánea a través de la almohadilla plantar, con varias dosis de los distintos virus, ECTV ΔCrmD, ECTV RevCrmD, ECTV RevCRDs, ECTV RevSECRET. En estos experimentos, el virus ECTV RevCrmD se consideró equiparable al virus parental (ECTV cepa Naval), una correlación que venía apoyada por ensayos anteriores en el laboratorio (Ruiz-Arguello y cols., 2012). Se siguió la evolución de los individuos durante 20 días en los que se fueron tomando datos individuales de peso, inflamación de la pata inoculada, síntomas y supervivencia (Figura 36).

Los ratones de todos los grupos infectados perdieron peso y enfermaron progresivamente hasta el día 9 postinfección, día a partir del cual, los animales que sobrevivieron a la infección, comenzaron a recuperarse (Figura 36A y B). Sin embargo, a este respecto no se encontraron diferencias intergrupos, e incluso los ratones infectados con el virus ECTV ΔCrmD que, como se verá más adelante, es un virus muy atenuado, perdieron peso y presentaron síntomas de enfermedad muy notorios (Figura 36A y B).

Donde sí se encontraron diferencias fue en los niveles de inflamación de la pata inoculada (Figura 36C). Los grupos de ratones infectados con ECTV ΔCrmD experimentaron, en todas las dosis, una inflamación de la pata a tiempos más tempranos que el resto de los virus y en las dosis más altas, con picos de inflamación mayores que en el resto de los grupos. Los ratones infectados con ECTV RevCrmD no mostraron indicios de inflamación en ningún momento y a ninguna dosis. Sin embargo, con los virus que codifican los dominios por separado, ECTV RevCRDs y ECTV RevSECRET, aunque la inflamación apareció más tarde que con ECTV ΔCrmD, la pata de estos animales también se inflamó significativamente (Figura 36C). Respecto a la inflamación de la pata, los ratones inoculados con ECTV RevSECRET mostraron a todas las dosis, un fenotipo intermedio, tanto en el tiempo de aparición como en pico de inflamación, entre ECTV RevCRDs y ECTV ΔCrmD. Esto fue especialmente notable en la dosis más alta (10^6 ufp), en donde como se muestra en la Figura 36C, ECTV RevSECRET comenzó a inflamarse un día después que ECTV ΔCrmD pero dos días antes que ECTV RevCRDs. A esta dosis, la inflamación en los animales infectados con ECTV ΔCrmD alcanzó los 5 mm mientras que, los grupos de ECTV RevCRDs y ECTV RevSECRET presentaron máximos de 3 y 4 mm, respectivamente.

Estos resultados sugieren que tanto la actividad anti-TNF como la actividad anti-CK son esenciales para que CrmD desarrolle su potencial antiinflamatorio completamente.

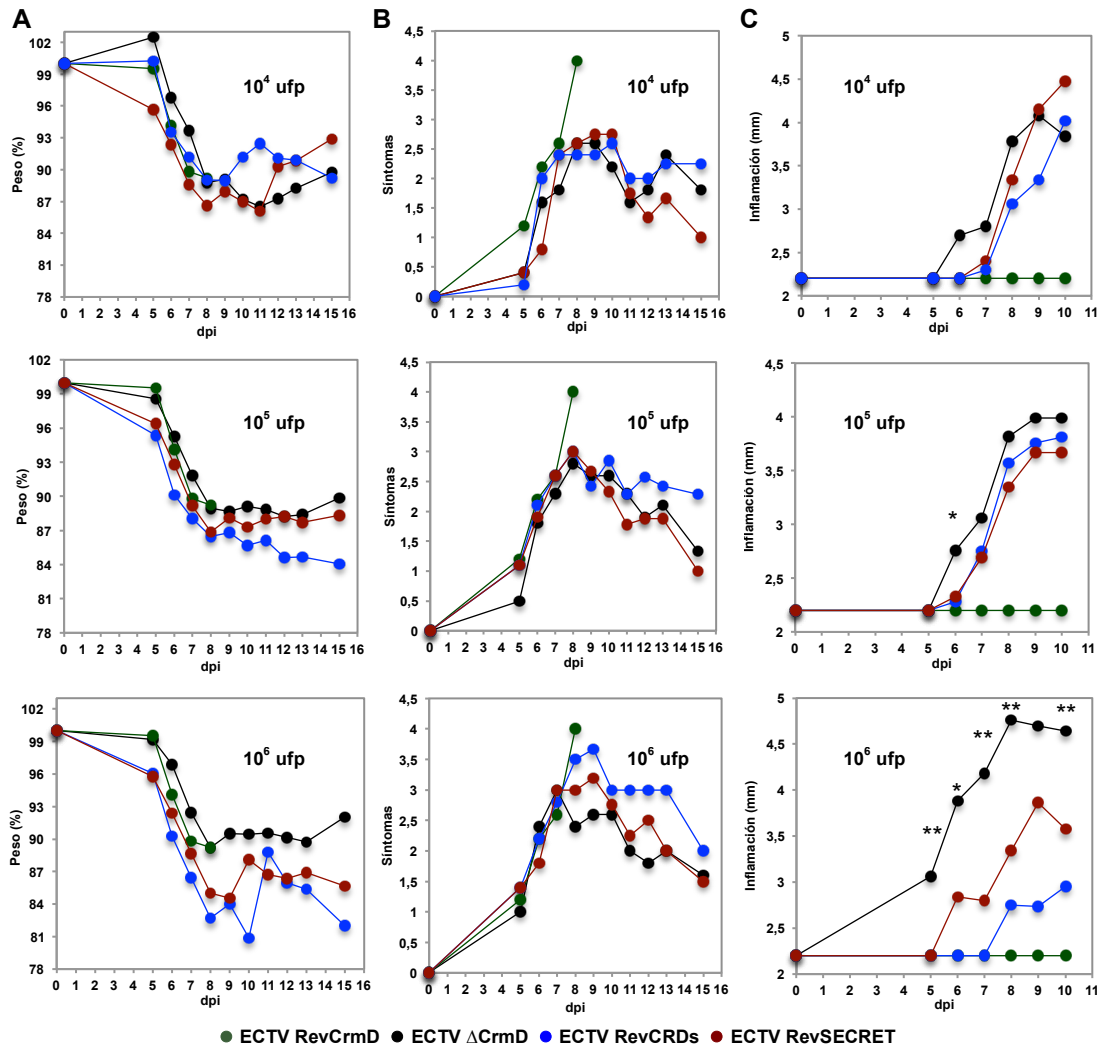


Figura 36. Pérdida de peso, síntomas e inflamación de la pata de los ratones susceptibles infectados con los distintos ECTV recombinantes. Grupos de 5 ratones BALB/c, ó 10 en el grupo inoculado con 10^5 ufp, fueron infectados a las dosis indicadas (10^4 , 10^5 y 10^6 ufp) con ECTV RevCrmD (verde), ECTV ΔCrmD (negro), ECTV RevCRDs (azul) y ECTV RevSECRET (rojo) a través de la almohadilla plantar de la pata izquierda. Se siguió la evolución de los animales recogiendo datos de sus pesos (A), síntomas (B) e inflamación de la pata infectada (C). Se representan las medias por grupo de cada dato a lo largo de 15 días tras la infección. Los asteriscos indican la significancia estadística entre los valores de inflamación de ECTV ΔCrmD y ECTV RevSECRET (*= $p<0,05$, **= $p<0,01$).

Al comparar los datos de supervivencia de cada grupo se confirmó que, efectivamente, CrmD es un importante factor de virulencia. En el experimento mostrado, ninguno de los cinco ratones sobrevivió a la infección con la menor dosis probada (10^4 ufp) de ECTV RevCrmD, situando la DL_{50} por debajo de ese nivel. De hecho, datos previos de nuestro laboratorio establecen un DL_{50} para este virus inferior a 10 ufp. Sin embargo, 9 de 10 ratones infectados con 10^5 ufp y 5 de 5 con 10^6 ufp de ECTV ΔCrmD continuaron vivos al final del experimento (Figura 37), lo que supone una DL_{50} de al menos 10^7 ufp, lo cual, está de acuerdo con los datos previos del laboratorio (Ruiz-Arguello y cols., 2012). En cuanto a los virus recombinantes para los dominios de CrmD por separado, se observó que también son virus altamente atenuados. El virus ECTV RevCRDs mostró una DL_{50} cercana a 10^5 ufp al matar 4 de 5 ratones infectados con 10^6 ufp y 3 de 10 con 10^5 ufp. Por su parte, el virus ECTV RevSECRET mostró un fenotipo intermedio entre ECTV ΔCrmD y ECTV RevCRDs, con una DL_{50} mayor de 10^6 ufp (Figura 37).

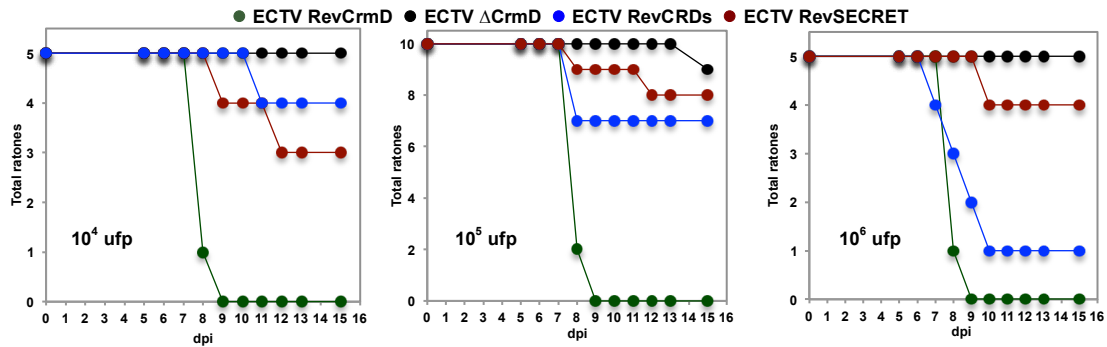


Figura 37. ECTV necesita de los dos dominios de CrmD para el establecimiento de una infección eficaz. Curvas de supervivencia de grupos de 5 o 10 ratones BALB/c infectados con las dosis indicadas (10^4 , 10^5 y 10^6 ufp) de los distintos virus (ECTV RevCrmD (verde), ECTV Δ CrmD (negro), ECTV RevCRD (azul) y ECTV RevSECRET (rojo)) a través de la almohadilla plantar de la pata izquierda.

Todos estos resultados demuestran que CrmD es un factor esencial para el control de la respuesta inmunológica del hospedador y para el establecimiento eficaz de la infección. De hecho, la titulación de la carga viral en el bazo de los animales a día 7 postinfección, reveló un menor título para los individuos infectados con ECTV RevCRDs, ECTV RevSECRET y ECTV Δ CrmD (Figura 38) sugiriendo que gracias a la proteína CrmD, el virus ECTV puede escapar al control de la respuesta del hospedador. El hecho de que los virus ECTV RevCRDs y ECTV RevSECRET sean virus altamente atenuados, apunta a que el virus necesita de ambas actividades inmunomoduladoras de CrmD y que por tanto la inhibición de los TNFSFLs y de las CKs es esencial para que el virus sobreviva en el hospedador. Queda por esclarecer el mecanismo ejercido por CrmD para desempeñar sus funciones y entender las diferencias entre el virus ECTV RevCRDs y el ECTV RevSECRET.

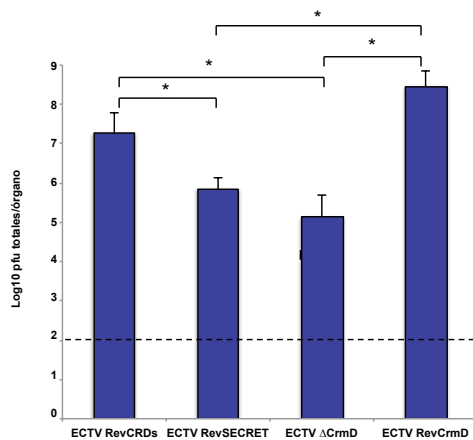


Figura 38. Carga viral en el bazo a día 7 postinfección. Una semana tras la infección de grupos de 4 animales con 10^5 ufp de los distintos virus (ECTV RevCrmD, ECTV Δ CrmD, ECTV RevSECRET y ECTV RevCRD), los ratones fueron sacrificados para la extirpación de los bazos. Los órganos fueron disgregados a través de mallas de un tamaño de poro de 70 μ m y los homogenados fueron titulados individualmente mediante plaqueo en células BS-C-1. Se muestran los títulos medios para cada virus en escala logarítmica, junto con las desviaciones estándar, en el total del órgano de los cuatro animales. La línea discontinua indica el límite de detección de la titulación. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos según la prueba U de Mann-Whitney.

4.4.4 La actividad del dominio anti-TNFSFLs de CrmD reduce la activación de células *natural killer* (NK) en los ganglios poplíteos

Como se ha demostrado, CrmD es fundamental para la virulencia de ECTV. Sabemos que esta proteína es capaz de inhibir la actividad de algunos TNFSFLs y de algunas CKs, sin embargo, aún se desconoce el mecanismo inmunológico por el cual el virus es capaz de evadir la respuesta del hospedador. En un intento de conocer el mecanismo que subyace tras las actividades inmunomoduladoras de CrmD, se realizaron análisis por citometría de flujo de órganos linfoides secundarios extirpados a diferentes días después de la infección. Concretamente se estudiaron las poblaciones linfocitarias y su estado de activación en los ganglios poplíteos y en el bazo, a día dos y 7 postinfección, respectivamente, de grupos de ratones susceptibles. Como control se analizó la respuesta en un grupo de animales inoculados con PBS (*mock*) (Figura 39).

Se infectaron ratones con los distintos virus recombinante generados. Dos días postinfección, se extirparon los ganglios poplíteos que drenaban la pata infectada y se obtuvieron suspensiones celulares individuales. Estas muestras se marcaron con anticuerpos específicos para células CD3+, NK (DX5+) y GzB+. Se observó que, mientras que los porcentajes de células CD3+ se redujo en los individuos infectados con cualquiera de los virus (43,0-55,4%) respecto al grupo *mock* (71,6%), la proporción de células NK, que en los ratones no infectados fue de un 0,7%, aumentó tras la infección y sin diferencias significativas entre los grupos de los distintos virus (2,3-3,1%) (Figura 39A y B). Sin embargo, el nivel de activación NK (DX5+GzB+) fue prácticamente el doble en los grupos infectados con ECTV Δ CrmD (22,1%) y ECTV RevSECRET (20,1%) en comparación con ECTV RevCrmD (10,8%) y ECTV RevCRDs (12,0%) (Figura 39C). Esto sugiere que la inhibición de los TNF α por parte del dominio CRD o de la proteína CrmD controla de manera significativa la activación de las células NK en el ganglio poplíteo a tiempos tempranos, mientras que cuando el TNF α está activo se produce una mayor respuesta de las células NK que, en último término, podrían controlar la infección. Este dato podría explicar la reducida carga viral observada en el bazo a los 7 días postinfección de los virus ECTV Δ CrmD y ECTV RevSECRET (Figura 38).

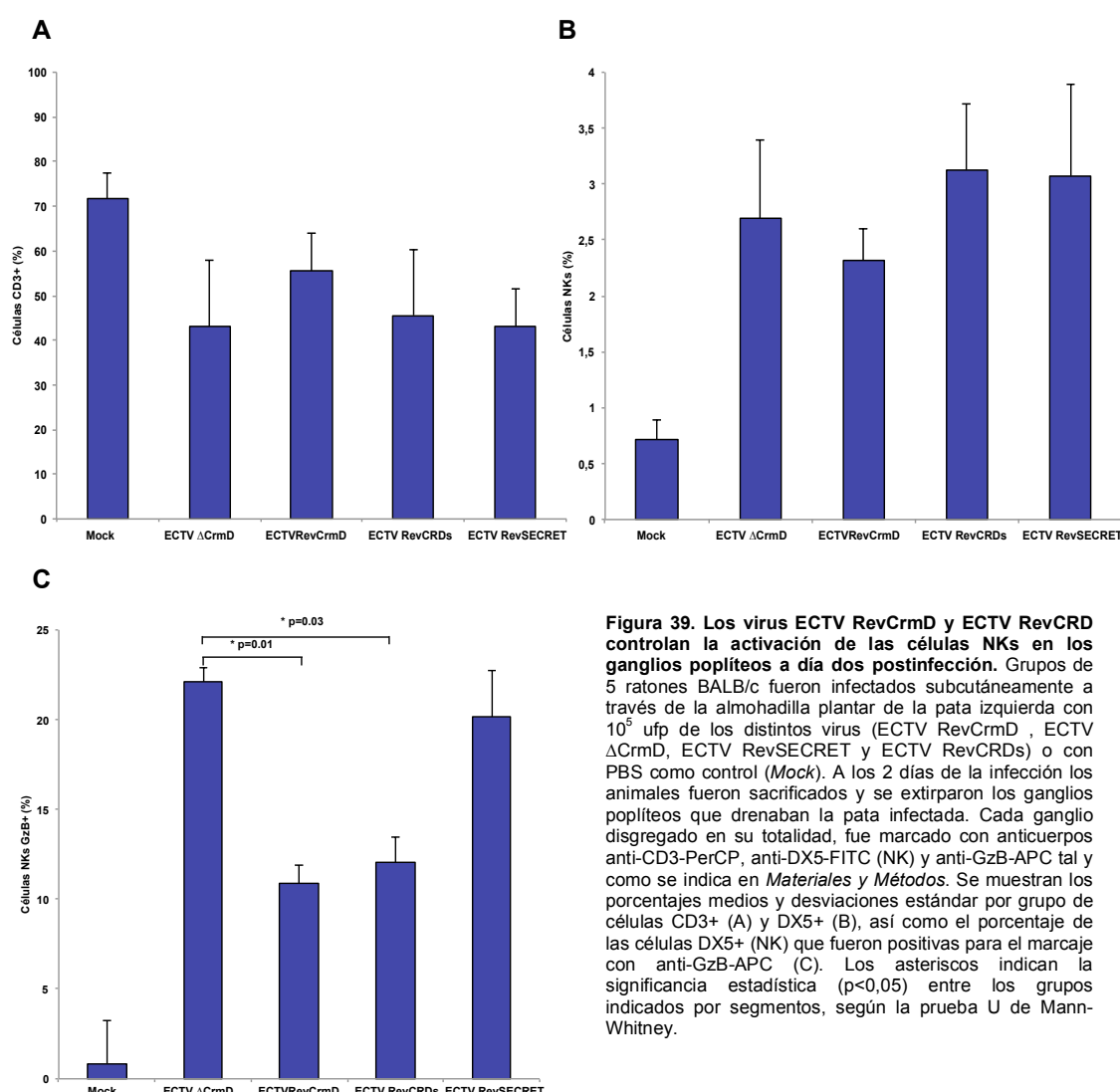


Figura 39. Los virus ECTV RevCrmD y ECTV RevCRD controlan la activación de las células NKs en los ganglios poplíteos a día dos postinfección. Grupos de 5 ratones BALB/c fueron infectados subcutáneamente a través de la almohadilla plantar de la pata izquierda con 10^5 ufp de los distintos virus (ECTV RevCrmD, ECTV Δ CrmD, ECTV RevSECRET y ECTV RevCRDs) o con PBS como control (*Mock*). A los 2 días de la infección los animales fueron sacrificados y se extirparon los ganglios poplíteos que drenaban la pata infectada. Cada ganglio disgregado en su totalidad, fue marcado con anticuerpos anti-CD3-PerCP, anti-DX5-FITC (NK) y anti-GzB-APC tal y como se indica en *Materiales y Métodos*. Se muestran los porcentajes medios y desviaciones estándar por grupo de células CD3+ (A) y DX5+ (B), así como el porcentaje de las células DX5+ (NK) que fueron positivas para el marcaje con anti-GzB-APC (C). Los asteriscos indican la significancia estadística ($p < 0,05$) entre los grupos indicados por segmentos, según la prueba U de Mann-Whitney.

En los bazos extirpados a día 7 postinfección no se encontraron diferencias significativas a nivel de poblaciones linfocitarias ni en su estado de activación entre los distintos grupos (resultados no mostrados). Sin embargo, sí se observó que gran parte de las células extraídas de los bazos de animales infectados con el virus ECTV RevCrmD estaban muertas (Figura 40A y B). Es reseñable el hecho de que el número de células CD8+ GzB+ en el bazo a día 7 fue equivalente en todos los virus excepto para el caso de ECTV RevCrmD (Figura 40D), debido a la ausencia de células CD8 (Figura 40C). Estos resultados sugieren que ni el dominio CRD ni el SECRET en solitario son suficientes para bloquear la respuesta en el bazo y que se necesita la acción conjunta de ambos para conseguir una infección eficaz en este órgano, como sucede con el virus parental, ECTV RevCrmD que, como ya se ha demostrado, a este tiempo, presenta mayor carga viral en el bazo que el resto de los virus (Figura 38).

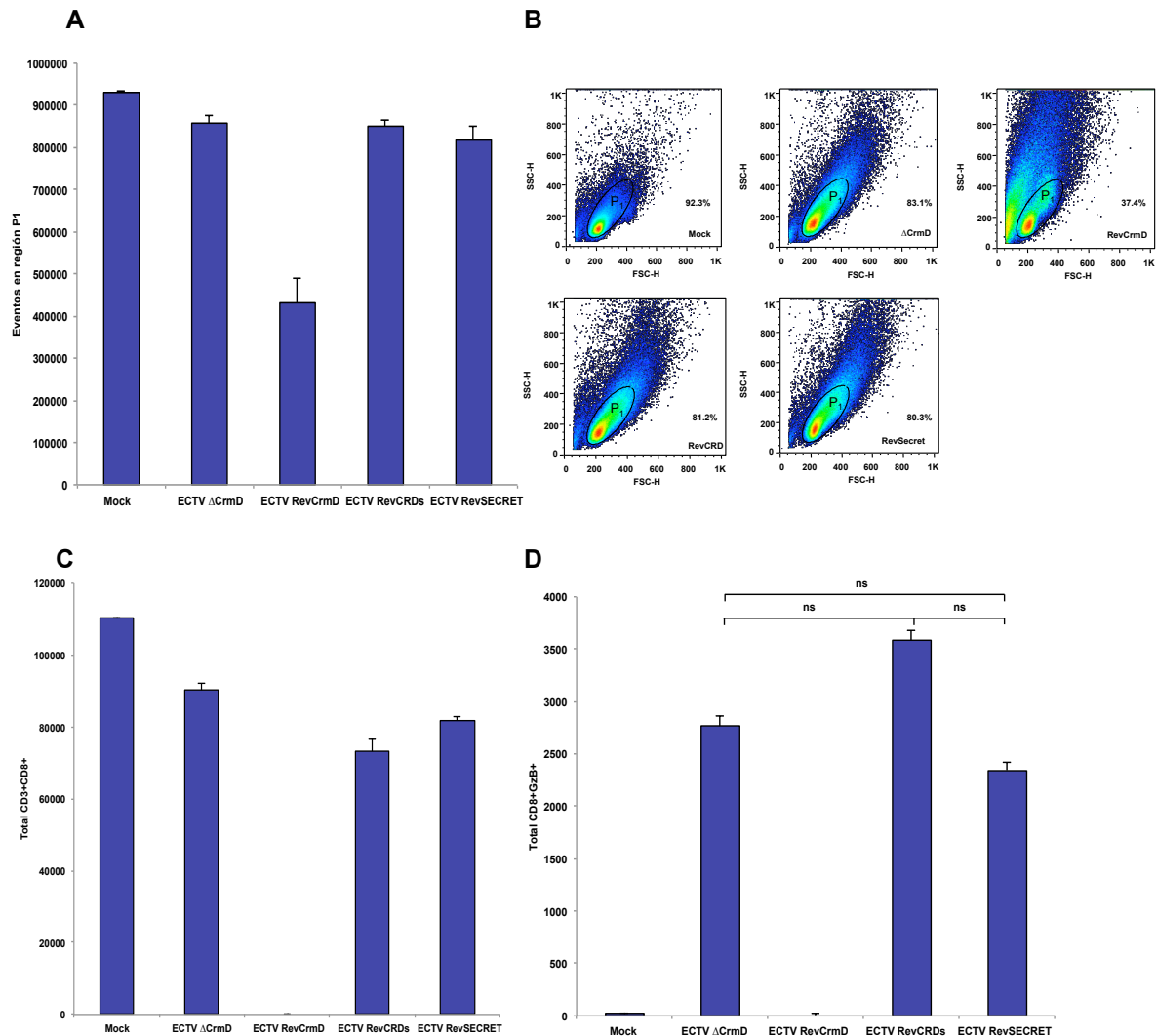


Figura 40. El dominio CRD de CrmD no es suficiente para una infección eficaz en el bazo. Grupos de 5 ratones BALB/c fueron infectados subcutáneamente a través de la almohadilla plantar de la pata izquierda con 10^5 ufp de los distintos virus o con PBS como control (Mock). A los 7 días de la infección los animales fueron sacrificados y los bazos fueron extirpados y disgregados mecánicamente. Se marcaron 10^6 células con anticuerpos anti-CD3-PerCP, anti-CD8-PE, anti-DX5-FITC y anti-GzB-APC tal y como se indica en *Materiales y Métodos*. A) Total de eventos englobados dentro la región P1 *side scatter* (SSC-H) – *forward scatter* (FSC-H) para las poblaciones de linfocitos. B) Diagrama de puntos SSC-H – FSC-H representativos de cada grupo. C) Medias y desviaciones estándar del total de células CD3+CD8+ presentes en los bazos de cada grupo. D) Medias y desviaciones estándar del total de células CD8+ GzB+ para cada grupo. ns: no significativo ($p > 0.05$) según la prueba U de Mann-Whitney.

4.5 Estudio de la interacción de CrmD con GAGs

Los GAGs son polisacáridos unidos a un núcleo proteico con un alto grado de sulfatación y carga. Se encuentran en la superficie celular y en la matriz extracelular y participan en importantes procesos biológicos como son la proliferación celular, morfogénesis, migración, patogénesis viral y unión de factores de crecimiento y citoquinas (Handel y cols., 2005). Por ejemplo, la unión de CKs a los GAGs es fundamental en la formación de gradientes quimiotácticos que guían la migración linfocitaria (Proudfoot y cols., 2003).

Algunas proteínas de modulación inmunológica de poxvirus, como el receptor soluble de interferón de VACV, B18 (Montanuy y cols., 2011), o la proteína de unión a CKs de ECTV, A41 (Ruiz-Arguello y cols., 2008), son capaces de unirse a la superficie celular mediante la interacción con GAGs. De esta manera, se sugiere que consiguen aumentar su concentración local entorno a los receptores de las citoquinas con las que interaccionan.

Al tratarse de una estrategia extendida entre las proteínas de modulación inmunológica de poxvirus, se ha estudiado la posible unión de CrmD a estos polisacáridos de superficie.

4.5.1 CrmD se une a GAGs con alta afinidad

Primeramente, se analizó la posible interacción de CrmD a GAGs mediante estudios de SPR con *chips* de heparina. Se acoplaron 50 RUs de heparina biotinilada a *chips* CM4 en los que previamente se habían inmovilizado 2.000 RUs de streptavidina. Seguidamente, se inyectó sobre el *chip* 300 nM de CrmD recombinante en buffer HBS-EP observándose una respuesta muy significativa e indicativa de una fuerte unión entre CrmD y la heparina. De hecho, se calculó la afinidad de esta interacción CrmD-heparina, inyectando distintas concentraciones de CrmD sobre el chip, obteniendo una constante de afinidad $K_D = 3,30$ nM (Figura 41A) lo que la sitúa en el mismo orden que las interacciones de B18 (Montanuy y cols., 2011) y A41 (Ruiz-Arguello y cols., 2008) con heparina.

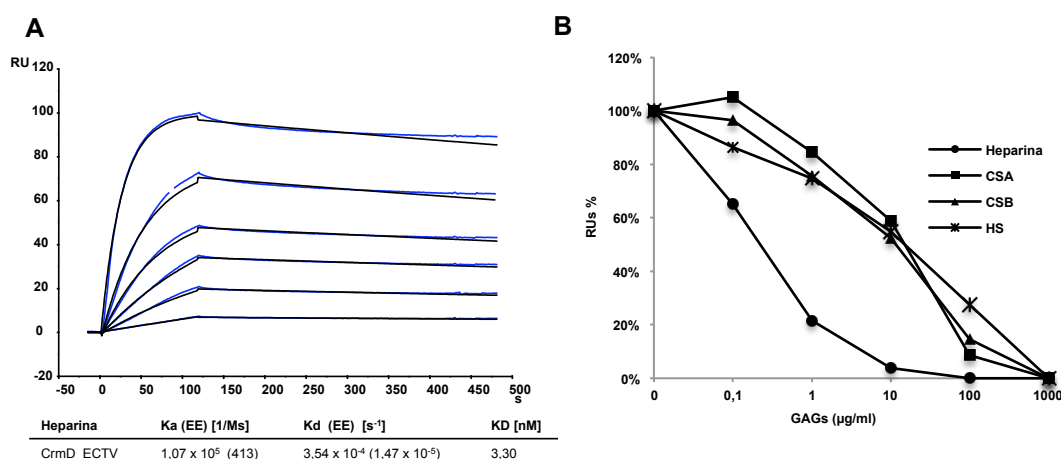


Figura 41. CrmD se une a GAGs con alta afinidad. A) Cinética mediante SPR de la unión de CrmD a un *chip* acoplado con 50 RUs de heparina. Se inyectaron distintas concentraciones de CrmD purificado (0-300nM) sobre un *chip* acoplado con 50 RUs de heparina a 30 µl/min. Los sensorgramas se alinearon y ajustaron a un modelo global de Langmuir 1:1. Se presentan las constantes de asociación (Ka), disociación (Kd) y afinidad (KD), junto con los errores estándar (EE). B) Competición de la unión de CrmD a heparina mediante GAGs solubles. Se incubaron concentraciones crecientes de distintos GAGs solubles (0-1.000µg/ml), heparina (●), condroitin-sulfato A (CSA) (■), condroitin-sulfato B (CSB) (▲) y heparán-sulfato (HS) (×), con 50nM de CrmD durante 15 min a 4°C, antes de pasar las mezclas sobre el *chip* de heparina. Se recogió la respuesta máxima en el equilibrio y se representaron los datos en porcentaje en relación a la respuesta detectada en ausencia de GAGs solubles.

Se estudió también la especificidad de la interacción de CrmD con GAGs realizando experimentos de competición en los que la unión de CrmD al chip de heparina se compitió con concentraciones crecientes de

distintos GAGs solubles. La heparina soluble fue la que presentó mejor eficacia a la hora de inhibir la unión de CrmD a la superficie. Sin embargo tanto el heparan-sulfato (HS) como el condroitin-sulfato de tipo A (CSA) y B (CSB), con menor grado de sulfatación, bloquearon también la interacción CrmD-heparina de manera dosis dependiente aunque con peor eficiencia que la heparina. Mientras que con menos de 1µg/ml de heparina se consiguió inhibir el 50% de la unión de CrmD a la superficie, se necesitaron al menos 10µg/ml de CSA, CSB o HS para bloquear el 50% de la interacción (Figura 41B). No se encontraron diferencias significativas entre HS, CSA y CSB. Estos datos sugieren que CrmD es capaz de interaccionar con distintos tipos de GAGs pero presenta una mayor afinidad por la heparina.

4.5.2 CrmD interacciona con GAGs a través del dominio SECRET

Por tanto, como se ha demostrado en esta Tesis, CrmD es una proteína de actividad dual, bloquea TNF y CKs, gracias a dos dominios independientes, CRD y SECRET. Además CrmD es capaz de interaccionar con GAGs, lo que potencialmente le atribuiría la capacidad de unirse a las superficies celulares o a la matriz extracelular. Con el fin de conocer si esta interacción con GAGs estaba mediada por uno u otro dominio o si por el contrario era una propiedad de la proteína completa, se inyectaron 300 nM de las proteínas recombinantes CRD-CrmD y CrmD163 sobre el chip de heparina. La proteína CrmD163, que contiene el dominio SECRET, fue capaz de interaccionar con heparina, sin embargo, para CRD-CrmD no se detectó unión (Figura 42A).

Las superficies celulares son ricas en GAGs. Para confirmar que la unión a GAGs de CrmD y CrmD163, permitía a estas proteínas retenerse en las superficies celulares, se utilizó un ensayo de citometría de flujo en el que se incubaron 200 nM de las distintas proteínas recombinantes con células L929 y MOLT4. Como se puede ver en la figura 42B, sólo CrmD y CrmD163 quedaron retenidos en la superficie de estas dos líneas celulares, mientras que no se detectó la presencia de CRD-CrmD. Las proteínas A41 y B18 se muestran como controles positivos de la interacción con la superficie y vCCI como control negativo.

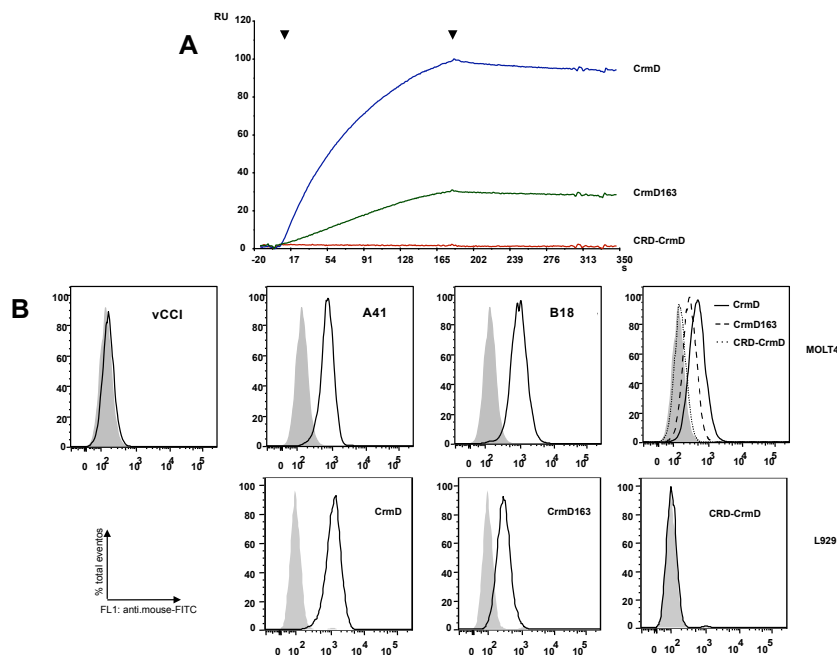


Figura 42. CrmD se une a heparina y a la superficie celular a través del dominio SECRET. A) Ensayo de unión a heparina mediante SPR. 300 nM de las proteínas purificadas CrmD, CrmD163 y CRD-CrmD, se inyectaron a 10 µl/min sobre *chips* de heparina. Se muestran los sensorgramas obtenidos para cada construcción. Las flechas invertidas indica el inicio y el fin de la inyección. B) Ensayo de unión a la superficie de células MOLT4 y L929 mediante citometría. 200 nM de las proteínas purificadas, vCCI de CPXV, A41 de ECTV, B18 de VACV, CrmD, CrmD163 y CRD-CrmD se incubaron con 300.000 células en hielo durante 30 min. Tras sucesivos lavados, se detectó la proteína retenida en la superficie mediante un anticuerpo de ratón anti-His (1:400) seguido de un secundario apropiado conjugado con Alexa488 (1:500). Se muestra la señal fluorescente (FL1:anti-mouseAlexa488) respecto al total de eventos analizados en porcentaje en muestras incubadas sin (gris) o con (blanco) proteína recombinante.

Con el fin de confirmar que la interacción de CrmD con la superficie celular estaba mediada por GAGs, se realizó un experimento de citometría de flujo similar al anterior en el que se utilizaron tres líneas celulares con distinto patrón de expresión de GAGs en superficie (Figura 43): i) células CHO-K1 que presentan un 40-70% de HS y un 30-55% de CS, ii) células CHO-745 con una expresión de GAGs reducida y iii) la línea CHO-618 que carece completamente de GAGs. Como se muestra en la Figura 43, mientras que CrmD y CrmD163, pero no CRD-CrmD, se unieron a la superficie de células CHO-K1, ninguna de las proteínas se retuvo en la superficie de células CHO-745 ó CHO-618. Estos resultados corroboraron que CrmD es capaz de unirse a los GAGs presentes en las membranas celulares y que lo hace a través del dominio SECRET.

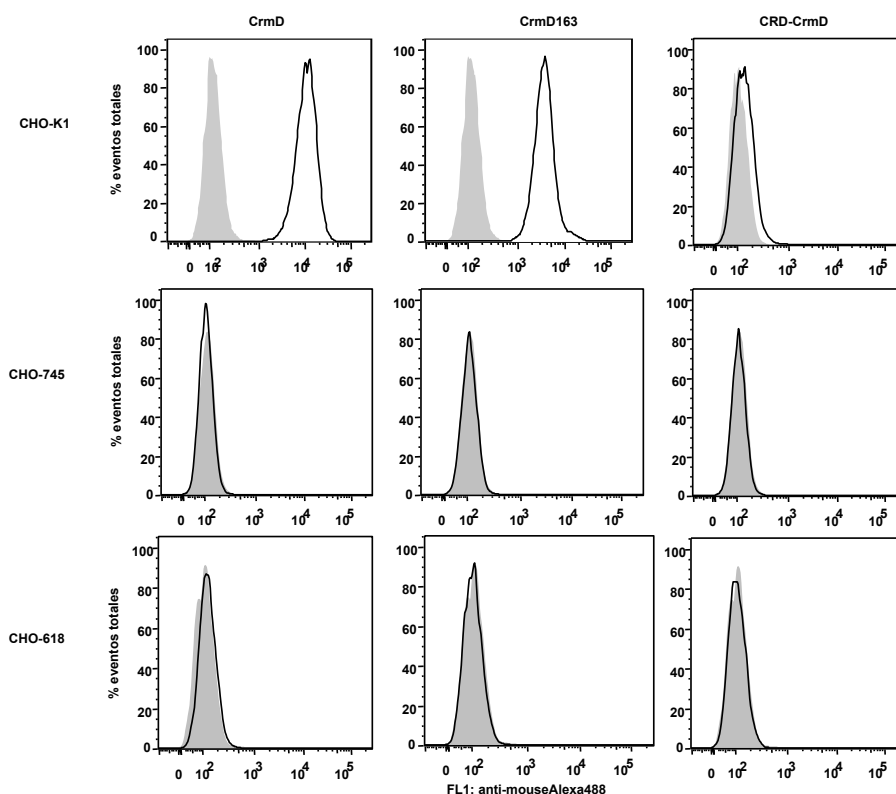


Figura 43. CrmD y CrmD163 se unen a la superficie celular gracias a su interacción con GAGs. Se incubaron 300.000 células CHO-K1 (expresión normal de GAGs), CHO-745 (expresión reducida de GAGs) y CHO-618 (sin GAGs) con 200 nM de las proteínas CrmD, CrmD163 y CRD-CrmD durante 30 min a 4°C. Tras varios lavados, las células fueron incubadas con una dilución 1:400 del anticuerpo de ratón anti-His para marcar la proteína retenida y se detectó mediante un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa488 (1:500). Se recogieron 20.000 eventos de cada muestra que fueron analizadas por el programa informático FlowJo. El área bajo la curva indica la fluorescencia respecto al total de eventos analizados, en porcentaje, de células incubadas sin (gris) o con (blanco) proteína recombinante.

Se llevó a cabo un experimento similar para la unión a células L929 utilizando los cuatro vTNFRs distintos purificados, CrmD_ECTV, CrmB_VARV, CrmC_CPXV y CrmE_CPXV. Como se ve en la Figura 44, sólo CrmB_VARV y CrmD_ECTV se unieron a células CHO-K1 mientras que CrmC_CPXV y CrmE_CPXV, carentes del dominio SECRET, como era de esperar, no quedaron retenidas (Figura 44A). Sin embargo, una construcción generada en baculovirus que expresaba CrmC fusionada al SECRET de CrmD (CrmC-SECRET) sí que interactuó con la superficie de éstas células (Figura 44A). Este mismo resultado se confirmó realizando una inmunofluorescencia de células L929 incubadas con 200 nM de cada vTNFR. Se observó marca fluorescente sólo en aquellas células que fueron incubadas con CrmD_ECTV, CrmB_VARV o CrmC-SECRET (Figura 44B). De esta manera, se pudo concluir que los vTNFRs, CrmD y CrmB, se unen a GAGs gracias a su dominio de unión a CKs SECRET.

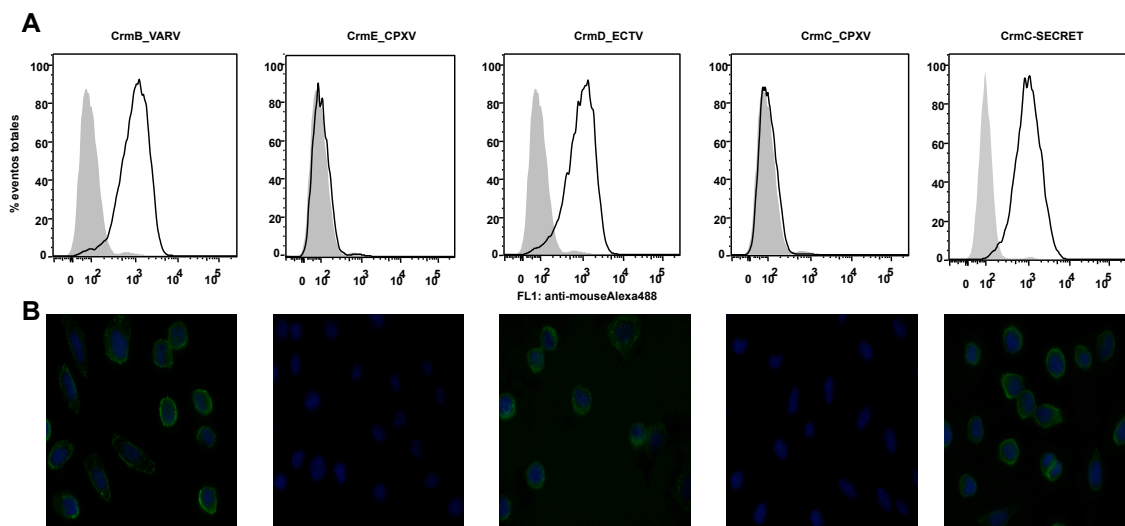


Figura 44. Los vTNFRs con dominio SECRET son capaces de unirse a la superficie celular. Se realizó un ensayo de unión a la superficie de células L929 de las proteínas purificadas, CrmB_VARV, CrmE_CPXV, CrmD_CPXV, CrmC_CPXV y una construcción CrmC-SECRET. Este ensayo se analizó tanto por citometría de flujo (A) como por inmunofluorescencia (B). A) Se muestra la fluorescencia (60x), respecto al total de eventos en porcentaje, en muestras incubadas con las distintas proteínas recombinantes indicadas (blanco) o sin proteína (gris). B) Los cubreobjetos sobre los que se sembraron células L929 fueron incubados con 100 nM de cada proteína durante 1 h a 4°C antes de la fijación con 4% PFA durante 30 min a RT. Se utilizaron los mismos anticuerpos que para la citometría de flujo pero con una dilución 1:500 del anticuerpo anti-His y 1:900 para el secundario conjugado con Alexa488. Los cubreobjetos fueron montados y las muestras se analizaron mediante un microscopio Axioskop 2 Plus (Zeiss).

4.5.3 Mediante la unión a GAGs, CrmD puede interactuar con TNFSFLs en la superficie celular

Para conocer si el CrmD unido a GAGs es capaz de interactuar con TNFSFLs se utilizaron dos aproximaciones distintas, un ensayo por SPR y una precipitación con heparina acoplada a una resina de agarosa.

Mediante SPR, se comprobó que el mTNF α fue capaz de interactuar con CrmD previamente unido a la superficie de heparina. Se inyectaron 300 nM de CrmD sobre el *chip* de heparina y sin regenerar la superficie se pasaron 100 nM de mTNF α . Se observó un aumento en la señal al inyectar el mTNF α que no se detectó cuando se pasó la citoquina tras la unión de 300 nM de B18 de VACV, una proteína no relevante para la unión de mTNF α pero que sí se une a GAGs (Figura 45A). Por tanto, CrmD puede interactuar simultáneamente con mTNF α y con GAGs.

Estos resultados se confirmaron mediante una precipitación con una resina de agarosa-heparina. Esta resina se incubó durante 1 h con 200 nM de B18 de VACV, CRD-CrmD y CrmD. Tras esta incubación y los lavados correspondientes se añadió a la resina 200 nM de mTNF α y se analizaron las muestras mediante *western blot* para detectar la presencia de mTNF α y de la proteína recombinante. Como se muestra en la Figura 45B, CrmD (línea 4) y B18 de VACV (línea 9), pero no CRD-CrmD (línea 6), se unieron a la resina y además el mTNF α quedó retenido sólo en la resina previamente incubada con CrmD (línea 4) (Figura 45B).

Con el fin de conocer también si esta interacción de CrmD con mTNF α en superficie, era además efectiva para bloquear los efectos de la citoquina, se realizó un experimento de citotoxicidad con células L929 con una variación. Las proteínas a estudiar, CrmD, CRD-CrmD, CrmC, CrmC-SECRET y hTNFR2 se incubaron previamente sobre las células a 10 μ g/ml. Tras una serie de lavados se añadió una cantidad activa de mTNF α (6 pM) y a las 16 h se comprobó la viabilidad celular. Como control, se repitieron las condiciones de este experimento pero preincubando las proteínas recombinantes con mTNF α y añadiendo la mezcla sobre células L929 después de 1 h. Se observó, que efectivamente, en solución, todas las proteínas inhibieron la

muerte celular. Sin embargo, sólo CrmD y la proteína CrmC–SECRET se retuvieron tras los lavados en la superficie de las células pudiendo interactuar posteriormente con el mTNF α inhibiendo su efecto (Figura 45C). Estos resultados sugieren que la unión de CrmD con GAGs no interfiere con la unión del TNF y que de esta manera CrmD puede inhibir el TNF en la superficie de las células. Además, al añadir el dominio SECRET a CrmC se consiguió una proteína (CrmC–SECRET) capaz de retenerse en la membrana celular y proteger del efecto citotóxico posterior del mTNF α .

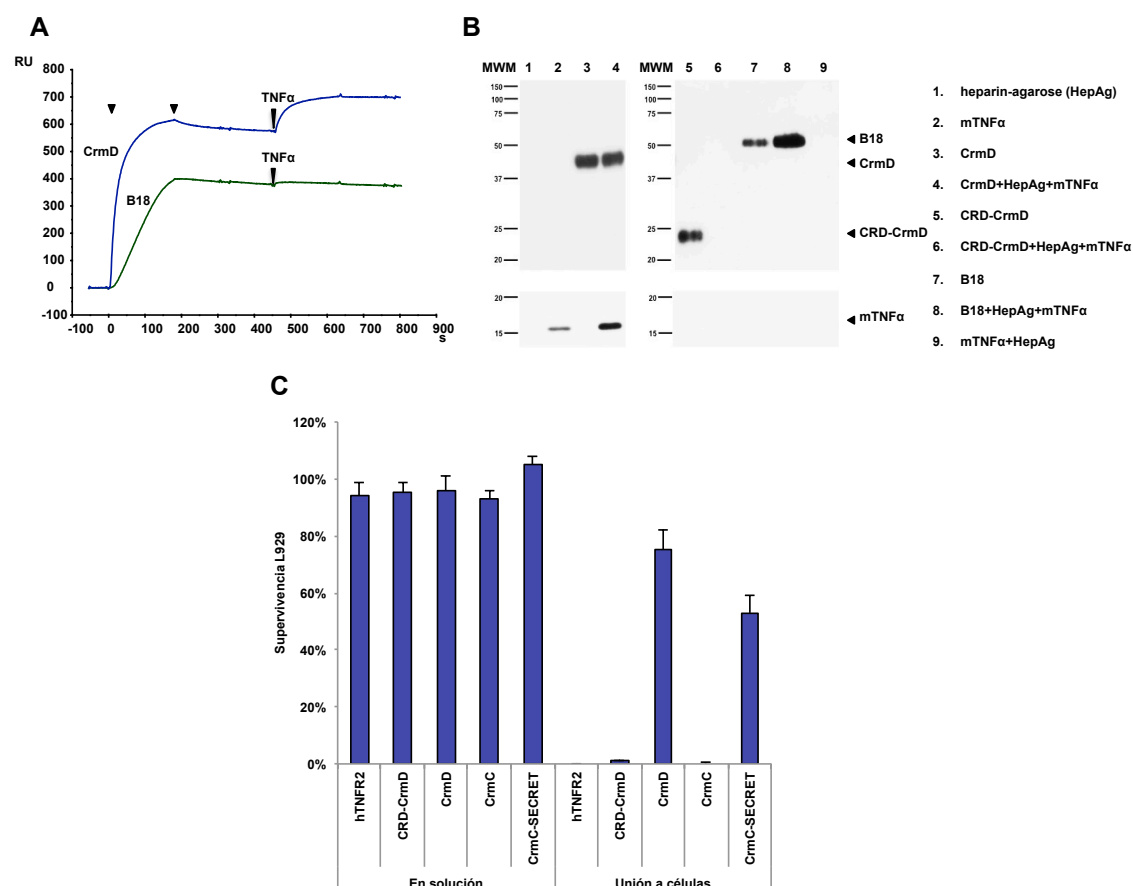


Figura 45. CrmD unido a GAGs puede interactuar e inhibir el mTNF α . A) Ensayo mediante SPR en el que 100 nM de TNF se inyectaron a 10 μ l/min sobre un *chip* de heparina antes o después de pasar sobre el *chip* 500 nM de CrmD (azul) o B18 de VACV (verde), sin haber regenerado la superficie. Los triángulos invertidos indican el inicio y el fin de la inyección de proteína recombinante y el comienzo de la inyección de TNF α . B) Experimento de precipitación con resina de agarosa-heparina. 400 nM de CrmD, CRD-CrmD y B18R_VACV fueron incubados con una resina de heparina durante 1h. Tras los lavados, las resinas se incubaron con 400nM de mTNF α durante 30 min adicionales y se analizó la presencia de proteína recombinante y mTNF α mediante *western blot* C) Ensayo de citotoxicidad de mTNF α sobre células L929. Para la unión a células, las proteínas, hTNFR2, CRD-CrmD, CrmC CrmC-SECRET y CrmD (10 μ g/ml), se incubaron sobre 30.000 células L929 durante 30 minutos a 37°C. Esas mismas condiciones se repitieron para la incubación en solución de las proteínas con el mTNF α . Las mezclas se añadieron posteriormente sobre células L929. Las muestras se analizaron por triplicado y se muestran las medias y las desviaciones estándar de la supervivencia en porcentaje en relación a los valores recogidos en ausencia de mTNF α .

4.5.4 La estructura tridimensional del dominio SECRET esconde un motivo de unión a GAGs

Se han definido dos secuencias consenso para la unión a GAGs, -XBBBXXBX- y -XBBXBX-, donde B es un residuo básico y X un residuo hidropático (Hileman y cols., 1998). Sin embargo, existe una gran diversidad en los motivos existentes en las proteínas de unión a GAGs. Se pueden encontrar este tipo de motivos en la secuencia de algunas proteínas de unión a GAGs como B18 de VACV (Montanuy y cols., 2011) o A41 de ECTV (Ruiz-Arguello y cols., 2008).

Por su parte, en la secuencia del dominio SECRET no se encuentran motivos similares que pudiesen estar mediando la interacción de GAGs. Gracias a los datos cristalográficos del SECRET, recientemente

publicados (Xue y cols., 2011), se ha podido comprobar que existen una serie de residuos básicos que, aunque alejados en la secuencia, quedan próximos en la estructura tridimensional conformando lo que bien podría ser un dominio de unión a GAGs.

Para conocer las base moleculares de la interacción de CrmD con GAGs, se construyeron cuatro mutantes puntuales en los que uno o varios residuos básicos se cambiaron por alaninas. Estos cuatro mutantes se denominaron GAG1 (K245A), GAG2 (R250A/R253A), GAG3 (K177A) y GAG4 (K177A/K218A) y se expresaron mediante el sistema de baculovirus (Figura 46A).

Con estos mutantes purificados se realizaron experimentos de unión a células con la línea celular CHO-K1. 200nM de cada mutante y de CrmD como control, se incubaron con células CHO-K1 a 4°C durante 30 min. Como se muestra en la Figura 46B, los mutantes GAG3 y GAG4 se unieron a la superficie celular con un grado similar que CrmD, mientras que la retención de la proteína GAG1 se vio claramente afectada y el mutante GAG2 apenas interaccionó con la superficie de las células CHO-K1. Este resultado sugiere que los residuos K²⁴⁵, R²⁵⁰ y R²⁵³, están involucrados en el establecimiento de los contactos con las cargas negativas de los GAGs de superficie.

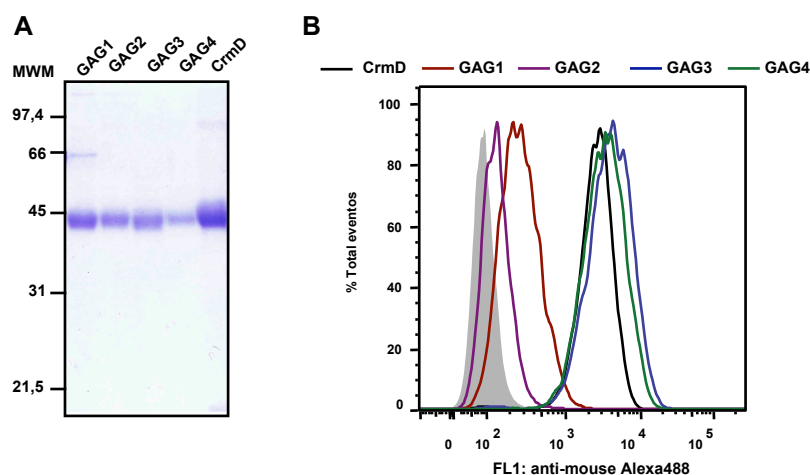


Figura 46. Expresión de los mutantes GAG1-4 y ensayos unión a células. A) Gel teñido con azul de Coomassie que muestra ~500 ng de cada uno de los mutantes GAG1-4 expresados mediante baculovirus recombinantes y purificados por cromatografía de afinidad Ni-NTA. B) Ensayo de unión a la superficie de células CHO-K1 mediante citometría de flujo. Se incubaron 200 nM de cada uno de los mutantes (GAG1:rojo, GAG2:morado, GAG3:azul, GAG4:verde) y de CrmD (negro) con 300.000 células. Se recogieron 10.000 eventos mediante un citómetro FACS Cantoll y se analizaron con el programa informático FlowJo. Se muestra la fluorescencia de cada muestra respecto al total de eventos analizados en porcentaje. La curva en gris marca la señal de fluorescencia de células incubadas en ausencia de proteína.

Se comprobó que los cambios de aminoácidos generados en los mutantes GAG1, GAG2, GAG3 y GAG4, no afectaban a la actividad anti-CK del dominio SECRET. Para ello, se realizó un experimento de quimiotaxis *in vitro* en el que se preincubaron concentraciones crecientes de estos mutantes (GAG1-4) con 70nM de mCCL25. Se comparó la capacidad de inhibir la migración de células MOLT4 en estas condiciones, de cada mutante respecto a la proteína CrmD. Tanto GAG1, GAG2, GAG3 como GAG4 inhibieron la migración inducida por mCCL25 de manera comparable a la proteína CrmD, reduciéndola al 50% o menos cuando se incubaron con 140 nM (relación molar 1:2) de las proteínas recombinantes con la CK (Figura 47). De esta manera, se demostró que los residuos mutagenizados en los mutantes GAG1-4 no están implicados en la interacción con CKs. Por lo tanto, hemos generado un mutante, GAG2, incapaz de unirse a las superficies celulares pero que no interfiere con la actividad anti-CK de CrmD.

De esta manera, mediante la mutación R250A/R253A (GAG2) hemos generado una versión de CrmD que presenta la misma capacidad de bloquear el TNF y las CKs en suspensión que la proteína parental, pero que carece de los residuos implicados para la interacción con GAGs y consecuente retención en la superficie celular. La generación de un ECTV recombinante para la expresión del mutante GAG2, podría aportar información de gran relevancia para comprender si esta unión de CrmD con GAGs tiene algún papel en la patogénesis de *mousepox*.

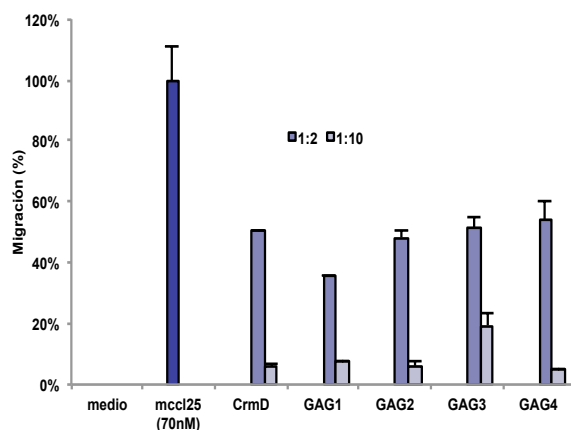


Figura 47. Las mutantes GAG1-4 inhiben la migración eficientemente. Experimento de quimiotaxis en *transwell* con células MOLT4. Se preincubaron cantidades crecientes de los mutantes GAG1-4 y CrmD con 70nM de mCCL25. Se muestra la migración media, junto con su desviación estándar, de cada una de las muestras analizadas por triplicado, en porcentaje respecto a la migración en ausencia de proteína recombinante. Para normalizar se utilizaron los datos tomados en ausencia de CK

4.5.5 Las bases moleculares del complejo SECRET-hCX₃CL₁ no explican la alta afinidad del dominio SECRET por otras CKs

Además de la estructura del dominio SECRET de CrmD, Xue y cols. definieron las bases moleculares del complejo SECRET-hCX₃CL₁ (Xue y cols., 2011). CrmD une la CK, hCX₃XL₁ con una afinidad ($K_D = 0,73 \mu M$) (Xue y cols., 2011) de casi tres órdenes de magnitud menos que otras CKs como la mCCL25 ($K_D = 4,86 nM$). Para confirmar sus observaciones estructurales, Xue y cols. construyeron un mutante del dominio SECRET, SECRET-AAA, en el que cambiaron por alaninas algunos residuos implicados en la unión a hCX₃XL₁ (D¹⁶⁷, E¹⁶⁹ y D³¹⁶), y observaron que SECRET-AAA no inhibía la actividad *in vitro* de esta CK (Xue y cols., 2011).

Con el fin de corroborar que la interacción del dominio SECRET con otras CKs de mayor afinidad que la hCX₃CL₁, obedecía las bases moleculares definidas por Xue y cols., se construyó el mutante análogo a la proteína SECRET-AAA, sobre la proteína completa, CrmD-AAA. Esta proteína fue producida en baculovirus y purificada tal y como se detalla en *Materiales y Métodos*. Como se muestra en la Figura 48, la proteína CrmD-AAA inhibió la migración de células MOLT4 inducida por mCCL25 de manera dosis dependiente. Sin embargo, se necesitó 5 veces más de la proteína CrmD-AAA para conseguir el mismo grado de inhibición que el alcanzado al preincubar la CK con CrmD (Figura 48). De acuerdo con esta observación, la afinidad medida por SPR para la interacción CrmD-AAA-mCCL25 presentó una $K_D = 22 nM$ (resultados no mostrados), una afinidad 5 veces inferior a la registrada para la unión de CrmD a esta CK ($K_D = 4,86 nM$). Por lo tanto, aunque los residuos D¹⁶⁷, E¹⁶⁹ y D³¹⁶ de CrmD parecen estar implicados también en la interacción con mCCL25, al contrario de lo que sucede con hCX₃CL₁, la unión de las CKs que CrmD une con alta afinidad, no fue neutralizada con la mutación a alaninas de estos tres aminoácidos.

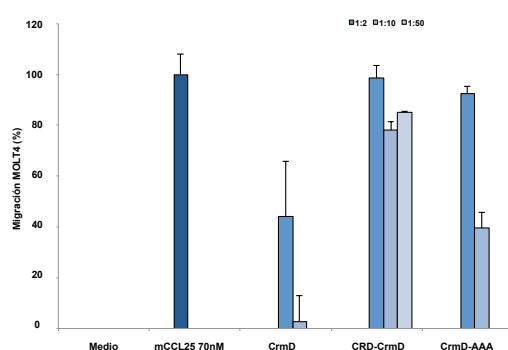


Figura 48. La proteína CrmD-AAA inhibe la migración inducida por mCCL25. Se purificó un mutante de CrmD, CrmD-AAA en el que se introdujeron las mutaciones D167A/E169A/D316A. Esta proteína junto con CrmD y CRD-CrmD, se preincubaron con 70nM de mCCL25 a las relaciones molares indicadas (1:2, 1:10 y 1:50). Se muestra la media y la desviación estándar de la migración de células MOLT4 en muestras analizadas por triplicado en relación a la migración en ausencia de CK (medio).

5 DISCUSIÓN

Los poxvirus cuentan con un genoma DNA de gran tamaño en el que incorporan genes con una función concreta en la modulación del sistema inmunológico de sus hospedadores. Mientras que virus más pequeños, como los virus RNA, recurren a la variabilidad antigénica, para dificultar ser reconocidos por los componentes de la respuesta anti-viral, los poxvirus y otros virus DNA, como los herpesvirus, han desarrollado un verdadero arsenal de proteínas dirigidas a la inhibición de algún proceso clave de la defensa que se pone en marcha frente a ellos. Así, CKs, IFNs, ILs y TNFSFLs, son dianas de estos mecanismos virales de escape inmunológico.

Entre estas proteínas virales inmunomoduladoras, se encuentran los conocidos como receptores virales o viroreceptores. Estas proteínas mimetizan perfectamente los dominios implicados en la unión del ligando de algunos receptores celulares. Este hecho sugiere, que los virus han captado genes celulares que posteriormente adaptan para llevar a cabo, con gran eficiencia, funciones concretas en la desregulación de la respuesta inmunológica. Los vTNFRs son un buen ejemplo de este mimetismo molecular. Al igual que los receptores celulares del TNF, TNFR1 y TNFR2, la secuencia de aminoácidos de los vTNFRs se caracteriza por la presencia de repeticiones de CRDs implicadas en la interacción con el ligando. Gracias a esta conformación, los vTNFRs pueden interactuar con algunos TNFSFLs con gran afinidad inhibiendo sus funciones.

Casi todas las especies de poxvirus codifican al menos uno de estos vTNFRs, lo cual resalta la importancia de estos inhibidores en la patogénesis de poxvirus y de los TNFSFLs en el establecimiento de una defensa anti-viral eficaz. Entre estos vTNFRs se encuentran CrmB (Hu y cols., 1994), CrmC (Smith y cols., 1996), CrmD (Loparev y cols., 1998) y CrmE (Saraiva y Alcamí, 2001), proteínas que fueron descubiertas como inhibidores del TNF α . A diferencia de CrmE y CrmC, CrmB y CrmD presenta un dominio C-terminal conocido como dominio SECRET, que les confiere la capacidad de unir e inhibir un pequeño grupo de CKs (Alejo y cols., 2006).

En esta Tesis se han descrito los potenciales ligandos de CrmD, tanto dentro de la TNFSFLs como de las CKs y se han estudiado las propiedades moleculares de estas interacciones. Se han analizado intensivamente las diferencias de especificidad y afinidad de los distintos vTNFRs con el objetivo de esclarecer por qué algunos poxvirus con un amplio rango de hospedador como CPXV, expresan los cuatro vTNFRs, mientras que otros virus, específicos de una sola especie, como VARV o ECTV, codifican por un único inhibidor del TNF, CrmB y CrmD, respectivamente. También, se ha estudiado el papel de CrmD y sus dos dominios (CRDs y SECRET) en la patogénesis de ECTV mediante la generación de virus recombinantes e infección de ratones susceptibles, BALB/c, demostrando que ambos dominios son fundamentales para el desarrollo de *mousepox*. Por último, se ha demostrado que el dominio SECRET posee además capacidad para unirse a las superficies celulares gracias a su interacción con GAGs.

5.1 Los dominios de CrmD, CRDs y SECRET, son estructural y funcionalmente independientes.

El objeto principal de estudio de esta Tesis ha sido el gen *E6* de la proteína CrmD codificado por el ECTV cepa Naval, un patógeno de ratón, con lo que se han analizado principalmente los posibles ligandos murinos. CrmD fue descrita por Loparev y cols. como una molécula capaz de interactuar con TNF α y LT α inhibiendo su actividad *in vitro* (Loparev y cols., 1998). Se ha visto en esta Tesis que, además de mTNF α y mLt α , CrmD puede unir con gran afinidad otros TNFSFLs, como son las dos formas de la mLt β , mAPRIL y mLIGHT. Se ha confirmado mediante ensayos de actividad *in vitro* que CrmD inhibe los efectos citotóxicos de mTNF α (K_D = 0,1 nM), mLt α (K_D = 4,27 nM) y mLt α 1 β 2 (K_D = 16,7 nM). Como se ha demostrado para el caso de la interacción del mTNF α con el TNFR2, la alta afinidad de CrmD por estas citoquinas posibilitaría la competición de la unión a los correspondientes receptores celulares. Por ejemplo, aunque se deben tener en cuenta las posibles variaciones experimentales, la afinidad del TNF α por TNFR1 y TNFR2, calculada mediante ensayos de unión a células en el equilibrio, fue de 0,019 nM y 0,42 nM (Grell y cols., 1998), respectivamente, valores próximos a la afinidad calculada mediante SPR para CrmD por esta citoquina.

Sin embargo, las interacciones de CrmD con mLT α 2 β 1 (K_D = 100 nM), mAPRIL (K_D = 62,6 nM) y mLIGHT (K_D = 289 nM), podrían no tener relevancia biológica ya que se encuentran lejos de las afinidades observadas para los correspondientes receptores celulares de estas citoquinas. Así, mAPRIL se une a su receptor mBCMA con alta afinidad (K_D = 16 nM) (Day y cols., 2005). Aunque esta afinidad es sólo cuatro veces superior a la afinidad de CrmD por mAPRIL, hemos demostrado que un exceso molar de 50 veces de CrmD no reduce la unión de mAPRIL a mBCMA en ensayos de SPR. Por el contrario, al preincubar mAPRIL con mBCMA soluble a una relación molar 1:1, se consiguió bloquear la unión completamente.

Por otra parte, una molécula de hLIGHT se une a una molécula de su receptor celular, hHVEM, con una afinidad de K_D =44 nM. Sin embargo, puesto que el receptor y la citoquina son en realidad trímeros, se sugiere que esta interacción tiene lugar con una aidez de 0,44nM (Harrop y cols., 1998). Aunque no se ha determinado la afinidad en el caso del LIGHT y HVEM de ratón, sería esperable que fuese similar a la del humano, lo cual corresponde a una unión mucho más fuerte que la interacción CrmD-mLIGHT (K_D =289nM). Por tanto, es predecible que CrmD no consiguiera impedir la unión de mLIGHT a mHVEM y sus efectos biológicos. La baja actividad mostrada por la citoquina mLIGHT disponible comercialmente, ha impedido poner a punto un ensayo para confirmar estas hipótesis. Más aún, tampoco se ha detectado nunca la unión de mLIGHT a sus receptores celulares (mHVEM, mLT β R) por SPR, lo que sugiere que, fuera del contexto de la membrana celular, esta interacción pierde afinidad.

La LT α es un homotrímero soluble con tres subunidades α . Sin embargo, estas subunidades α pueden oligomerizar con monómeros tipo β para dar lugar a dos tipos de citoquinas de membrana clasificadas como LT β : LT α 1 β 2 y LT α 2 β 1. La LT α señala a través de TNFR1 y TNFR2 y con menor afinidad por HVEM, sin embargo, la LT β posee un receptor celular específico, el LT β R (Figura 7). Mientras que CrmD une con alta afinidad mLT α (K_D =4,27 nM), interacciona con mLT α 1 β 2 y mLT α 2 β 1 con menor afinidad, K_D = 16,7 nM y K_D = 100 nM, respectivamente. De acuerdo con esto, CrmD inhibió sólo parcialmente la muerte celular provocada por mLT α 2 β 1 sobre células L929, necesitando un exceso molar de 50 veces para proteger al 15%. Sin embargo, en esas mismas condiciones, CrmD protegió al 100% de las células tratadas con mLT α y mLT α 1 β 2. Aunque sí hemos demostrado que CrmD puede interaccionar con el tmTNF α y que por lo tanto su actividad no se restringe únicamente a las moléculas solubles, sería importante confirmar la capacidad de CrmD de interaccionar con la LT β en su verdadero contexto, anclada a la membrana. También podría suceder que en la célula infectada CrmD secuestrase los monómeros de LT α impidiendo la formación de un trímero funcional de LT β en la superficie celular. Por lo tanto, aunque molecularmente las interacciones de CrmD con LT β , APRIL y LIGHT son interesantes, concluimos que la unión de CrmD al mTNF α y mLT α son las de mayor interés biológico.

Se han definido también los ligandos quimiotácticos del dominio SECRET de CrmD. Anteriormente se describió en nuestro laboratorio que CrmB de VARV podía interaccionar con alta afinidad (0,3-30,0nM) con hCCL20, hCCL25, hCCL28, hCXCL12 β , hCXCL13, hCXCL14, hXCL1. CrmD de ECTV une un pequeño grupo de CKs, entre las que se encuentran las mismas hCKs unidas por CrmB y las mCKs, mCCL24, mCCL25, mCCL27, mCXCL11, mCXCL12 β , CXCL13 y mCXCL14 con afinidades comprendidas entre 4,86 y 40,20 nM. ECTV sólo infecta ratones mientras que VARV es un virus humano, es por esto por lo que los ligandos más relevantes biológicamente de los dominios SECRET de CrmD y CrmB sean las mCKs y las hCKs, respectivamente. Además, ECTV invade el organismo a través de abrasiones de la piel mientras que VARV lo hace por las vías de respiratorias. Por tanto, estos virus deben de hacer frente a un ambiente quimiotáctico muy distinto. De acuerdo con esto, el dominio SECRET de CrmB une CKs expresadas en los pulmones como hCCL20, hCCL28 y hXCL1, mientras que CrmD interacciona con CKs secretadas en la piel como mCCL27, expresada por los queratinocitos y células dendríticas de la piel y que induce la migración de linfocitos T CCR10+ (Homey y cols., 2002). Hemos demostrado un efecto inhibitorio de CrmD sobre mCCL27, mCCL25 y mCXCL13. Sin embargo, a pesar de la unión de CrmD a mCXCL12 β , no se observó ningún efecto de CrmD sobre la actividad de esta CK, lo que sugiere que la interacción CrmD-mCXCL12 β carece de relevancia biológica. De hecho, sorprende que tanto CrmD como CrmB unan CXCL12 β con alta

afinidad pero no interaccionen con CXCL12 α ya que estas dos CKs, que comparten el mismo receptor CXCR4, sólo se diferencian en la presencia de cuatro aminoácidos más (RFKM) en la región C-terminal de la CXCL12 β .

Por tanto, CrmD es una molécula viral con una doble función inmunomoduladora, una propiedad que también se ha observado en otras proteínas virales como M-T7, la proteína de unión a IFN γ y a CKs de MYXV (Lalani y cols., 1997). Sin embargo, en el caso de CrmD y CrmB tienen la particularidad de ser dos actividades desempeñadas por dos dominios independientes que permiten a CrmD interaccionar con TNFSLs y CKs, de manera simultánea. CrmD y CrmB se describieron inicialmente como vTNFRs que presentaban en su dominio N-terminal cuatro CRDs al igual que TNFR1 y TNFR2, mientras que los otros dos vTNFRs, CrmC y CrmE solo contienen tres CRDs. Sin embargo, la comparación de las secuencias de CrmD con la de otras proteínas con dominio SECRET, SCP1–3, reveló que existían dos residuos (F¹⁶³ y N¹⁶⁴ en CrmD) conservados en todos los dominios SECRET. Estos residuos están incluidos en la supuesta secuencia del CRD4 de CrmD. Para definir la secuencia del dominio SECRET se analizó la afinidad por CKs de dos formas de este dominio, CrmD163 que comenzaba desde la fenilalanina conservada en el CRD4 y CrmD181 que empezaba después del CRD4. Se observó que CrmD163 presentaba afinidades por las CKs significativamente mayores que CrmD181 y comparables a las de CrmD completo. Esto sugirió que CrmD contiene tres CRDs seguidos del dominio SECRET, una observación que se confirmó con la proteína CRD–CrmD que, conteniendo únicamente los tres primeros CRDs, mostró la misma capacidad que CrmD de bloquear los efectos citotóxicos del TNF α . Al igual que CrmD, M-T2, el inhibidor del TNF α de MYXV, fue descrito como una proteína con cuatro dominios CRDs, pero nuevamente, un mutante de delección del pseudodominio CRD4 de M-T2, dio lugar a una proteína más corta que bloqueó el TNF α de conejo con la misma eficiencia que M-T2 completa (Schreiber y McFadden, 1996).

Recientemente, la estructura del dominio SECRET de CrmD ha sido resuelta (Xue y cols., 2011). De acuerdo con lo explicado anteriormente, la secuencia del dominio SECRET cristalizado comenzó en la F¹⁶³. Este trabajo demuestra que el dominio SECRET de CrmD adopta una conformación muy similar a la vCKBP, vCCI/35K (Arnold y Fremont, 2006; Zhang y cols., 2006a) (Figura 49), aunque la secuencia de aminoácidos es muy distinta. Este mismo plegamiento se observó también en la estructura tridimensional de la A41 (Bahar y cols., 2008) y sería de esperar que estuviese también presente en las SCPs. A pesar de estas similitudes estructurales existen grandes diferencias funcionales entre estas vCKBPs. Por ejemplo, A41 que no inhibe la unión de las CKs a los CKRs celulares (Ruiz-Arguello y cols., 2008), evita la interacción CK-GAGs, mientras que el dominio SECRET, como vCCI, bloquea el sitio de unión al receptor de las CKs pero sólo interacciona con 7 CKs, lo cual, contrasta con el amplio rango de CKs unidas por la vCCI (Burns y cols., 2002). Así, el dominio SECRET, SCP1-3, vCCI y A41, que constituyen una familia de vCKBPs con un posible origen común, han adaptado una misma configuración tridimensional al desarrollo de distintas actividades anti-CK.

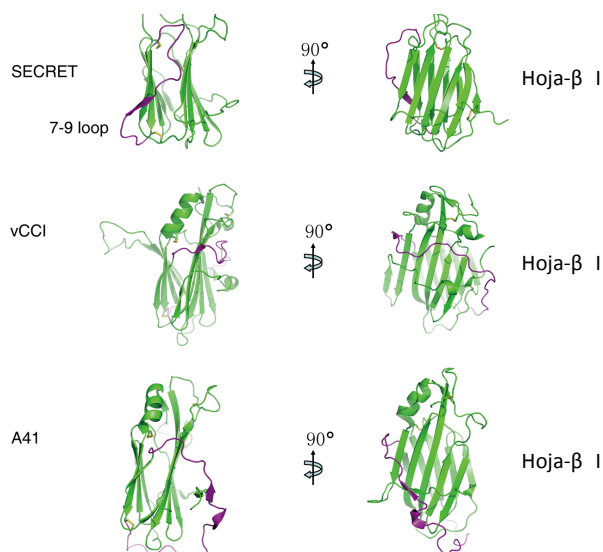


Figura 49. Comparación estructural del dominio SECRET con vCCI y A41. Representación estructural en "lazos" verdes de las proteínas vCCI, A41 y el dominio SECRET. En morado se resalta la distinta conformación del *loop* 7-9 en estas proteínas. Extraído de Xue y cols. (2011)

Xue y cols. consiguieron dar las bases moleculares de la interacción de hCX₃CL₁ con el dominio SECRET, una unión que se da con una baja afinidad ($K_D=0,73 \mu\text{M}$). La resolución del complejo hCX₃CL₁-SECRET mostró que la proteína se une primordialmente por el dominio de unión a GAGs de la CK, bloqueando parcialmente la región de unión al receptor. Además generaron un mutante del dominio SECRET, SECRET-AAA, en el que cambian por alaninas aquellos residuos ácidos directamente implicados en la unión con la CK, D¹⁶⁷, E¹⁶⁹ y D³¹⁶. Sin embargo, en el laboratorio, se generó y purificó este mismo mutante sobre la secuencia completa de CrmD, CrmD-AAA y se observó que no sólo, une mCCL25 con alta afinidad, sino que además, inhibe la migración inducida por mCCL25. Es posible que las bases moleculares descritas para la interacción del dominio SECRET a un ligando de baja afinidad ($K_D=0,73 \mu\text{M}$), como hCX₃CL₁, sean distintas a las que imperan en la unión de ligandos de alta afinidad como mCCL25 ($K_D=4,86\text{nM}$). Por lo tanto, sigue siendo importante el estudio de la biología estructural de otros complejos del SECRET con otras CKs.

En resumen, hemos determinado que el vTNFR de ECTV, CrmD, además de interaccionar con gran afinidad con TNF α y LT α , puede unir otros TNFSFLs como LT β , APRIL y LIGHT. CrmD no evita la interacción de APRIL a su receptor celular pero sí inhibe eficientemente la actividad *in vitro* de la LT β (LT α 1 β 2). Hemos establecido también los ligandos quimiotácticos de su dominio SECRET. Puesto que se trata de una proteína expresada por un patógeno de ratón, la inhibición de CrmD de la migración inducida por mCXCL13, mCCL25 y mCCL27, demostrada en esta Tesis, podría tener gran relevancia en patogénesis. Además, se ha demostrado que estas dos actividades, anti-TNFSFLs y anti-CK, reunidas en una misma proteína, no se interfieren entre sí y que por tanto, CrmD puede interaccionar simultáneamente con TNFSFLs y CKs.

5.2 Los vTNFRs presentan distinta especificidad de ligando gracias a estrategias moleculares propias

Se ha conseguido resolver la estructura tridimensional de algunos complejos de TNFSFLs con sus receptores: LT α -TNFR1 (Banner y cols., 1993), TNF α -TNFR2 (Mukai y cols., 2010), OX40L-OX40 (Compaan y Hymowitz, 2006) y TRAIL-DR5 (Hymowitz y cols., 1999). Estos receptores presentan un patrón de unión a su respectivos ligandos muy similar, con tres moléculas del receptor interaccionando con el trímero del ligando. Sin embargo, no existen datos que aclaren las bases moleculares de la unión al TNF α de los vTNFRs. Sí se conoce la estructura de la proteína de unión al TNF α de YLDV, 2L, en complejo con el TNF α (Yang y cols., 2009), pero esta proteína sigue una estrategia molecular completamente diferente a lo esperado para un vTNFR y a diferencia de algunos de éstos, como CrmB y CrmD, 2L no une LT α (Rahman y cols., 2009). 2L carece de similitud de secuencia con los TNFRs (Figura 50) y adopta un plegamiento muy parecido al de MHC-I. A pesar de esta topología, 2L ejerce una eficiente actividad anti-TNF α (Brunetti y cols., 2003) y es un buen ejemplo de cómo los virus han captado genes de sus hospedadores para después modificarlos y especializarlos en una nueva función en beneficio de la infección.

La estructura del vTNFR de VACV, CrmE ha sido resuelta (Graham y cols., 2007) (Figura 50B). Esta proteína adopta una conformación muy similar a la de los TNFSFRs, pero en lugar de los cuatro CRDs típicos de los receptores celulares, TNFR1 y TNFR2, CrmE presenta en su dominio de unión al ligando tres repeticiones CRDs. En esta tesis se ha demostrado que CrmD también posee únicamente tres CRDs antes del dominio SECRET. De hecho, incluso en los receptores celulares, todavía se desconoce el papel del CRD4, que no parece mediar ninguna interacción con el ligando (Banner y cols., 1993; Mukai y cols., 2010). Es posible que sea un dominio necesario para enlazar el dominio extracelular con el dominio citoplasmático y por ello los vTNFRs, CrmB, CrmC, CrmD, CrmE y M-T2 han prescindido del CRD4. El TNFR2 es procesado por la metaloproteasa TACE para dar lugar a un receptor soluble (sTNFR2) que regula la actividad del TNF α uniéndose a él en solución (Peschon y cols., 1998). Sería interesante determinar si el sTNFR2 tiene únicamente tres dominios CRDs.

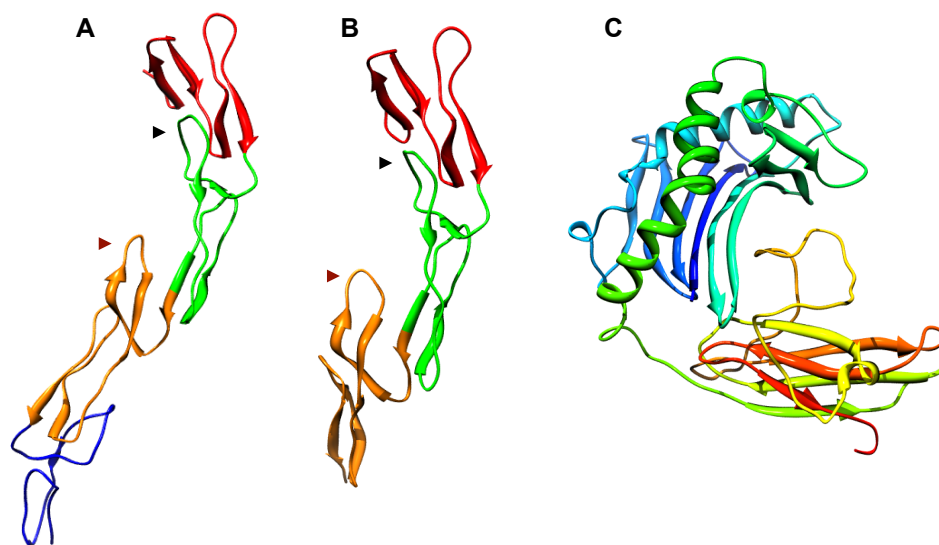


Figura 50. CrmE adopta una estructura tridimensional similar al TNFR2. Representación estructural en “lazos”, realizada con el programa Chimera de las proteínas: A) hTNFR2 (PDB: 3ALQ), B) CrmE_VACV (PDB: 2UWI) y C) 2L_YLDV (PDB: 3IT8). En A y B se resaltan los distintos CRDs en colores: CRD1 (rojo), CRD2 (verde), CRD3 (naranja) y CRD4 (azul). Las puntas de flecha indican la posición del “loop de los 50” (negra) y el “loop de los 90” (roja).

Los complejos TNFSFL–TNFSFR que han sido resueltos han permitido determinar que el CRD2 y el CRD3 del receptor son los principales responsables de la unión al ligando. Se definieron dos regiones en estos dominios, el “*loop* de los 50” en el CRD2 y el “*loop* de los 90” en el CRD3 (Figura 50). Existen evidencias que sugieren que mientras que en el “*loop* de los 50” se concentran las interacciones responsables de la afinidad de la unión, el “*loop* de los 90” alberga aminoácidos que regulan la especificidad por el ligando. Estos *loops* se encuentran conservados en los vTNFRs. Al superponer las estructuras de CrmE y hTNFR2 con los modelos estructurales de CrmB, CrmC y CrmD, se observa que mientras que el “*loop* de los 50” solapa perfectamente en todas las proteínas, el “*loop* de los 90” adopta un plegamiento distinto en cada uno de estos receptores (Figura 51). Esta divergencia en el “*loop* de los 90” podría ser la responsable de las diferencias de especificidad entre los distintos vTNFRs.

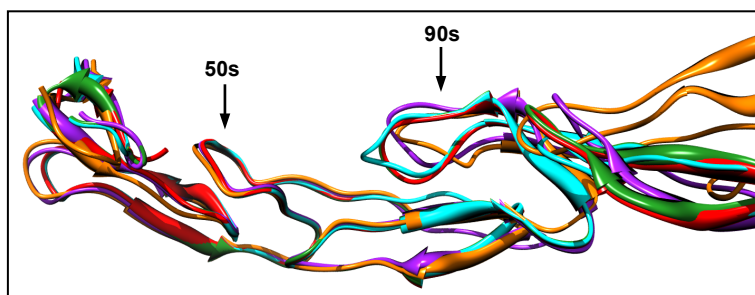


Figura 51. Comparación estructural de los *loops* de los 50 y los 90 en receptores del TNF. Alineamiento estructural de CrmD (rojo), CrmB (verde), CrmC (cian), CrmE (morado) y hTNFR2 (naranja). Se ha aumentado la imagen para visualizar con detalle los *loops* de los 50 (50s) y de los 90 (90s) que se indican con flechas.

Hemos evaluado las afinidades y actividades de 6 vTNFRs frente al TNF α y la LT α de origen, tanto humano como murino. Entre estos vTNFRs se incluyeron ortólogos de un mismo vTNFR codificado por distintos virus con el objetivo de estudiar posibles adaptaciones de la actividad de estas proteínas al rango de hospedador del virus que las expresa. Así, se caracterizaron las propiedades inmunomoduladoras de los cuatro vTNFRs codificados por CPXV, CrmB_CPXV, CrmC_CPXV, CrmD_CPXV y CrmE_CPXV y los únicos vTNFRs presentes en el genoma de VARV y ECTV, CrmB_VARV y CrmD_ECTV, respectivamente.

Como ya se ha demostrado, CrmB y CrmD presentan un dominio C-terminal adicional (SECRET) que les permite inhibir la actividad de un reducido grupo de CKs. Además, CrmB y CrmD, a diferencia de CrmC y CrmE que son inhibidores específicos del TNF α , son capaces también de inhibir los efectos citotóxicos de la

LT α . Los orthopoxvirus más virulentos como VARV, CPXV y ECTV contienen siempre en su genoma el gen de *CrmB* o en su defecto de *CrmD* (Tabla 1). Esta observación, dado que CrmC y CrmE inhiben el TNF α con una eficacia comparable a CrmB y CrmD, sugiere que la inhibición de CKs a través del dominio SECRET y el bloqueo de la actividad de la LT α , podrían jugar un papel importante en la patogénesis de estos virus.

También se observaron, entre estos vTNFRs, diferencias en la capacidad de unir un mismo ligando según fuese de origen humano o murino. Se confirmó que CrmE y CrmC unen hTNF α y mTNF α , respectivamente. Sin embargo, aunque la ausencia de actividad anti-hTNF α de CrmC se pudo explicar por una reducción de un orden de magnitud de su afinidad respecto a la de los otros vTNFRs, CrmE presentó una afinidad por mTNF α comparable a la de CrmC, CrmB o CrmD, con una K_D inferior a 1 nM. No obstante, esta alta afinidad de CrmE por el mTNF α no fue suficiente para inhibir el efecto citotóxico de la citoquina *in vitro*, ni para bloquear la unión del mTNF α a TNFR1 eficazmente. Por lo tanto, parece que CrmE no bloquea los residuos del mTNF α implicados en la unión al receptor celular.

No se encontraron diferencias entre los ortólogos de CrmB de CPXV y VARV, proteínas que presentaron comportamientos similares frente a todas las citoquinas probadas. Sin embargo, CrmD_CPXV, a pesar de tener afinidades comparables en todos los casos a CrmD_ECTV, mostró una peor eficacia en el bloqueo de la actividad de las citoquinas *in vitro*, sobre todo en el caso del TNF α . Una diferencia realmente sorprendente si se tiene en cuenta que la homología de secuencia entre CrmD_ECTV y CrmD_CPXV es del 96%. Quizás, el cambio producido en el núcleo del “loop de los 50” en el que una serina de CrmD_ECTV (S⁷⁹) se convierte en una isoleucina (I⁷⁹) en CrmD_CPXV, junto con la presencia de una histidina (H⁹³ de ECTV_CPXV) en un motivo de CrmD_ECTV con cierto carácter electronegativo (⁹²NQVE⁹⁵ en CrmD_ECTV por ⁹²NHVE⁹⁵ en CrmD_CPXV) (Figura 52), determinen una interacción de CrmD_CPXV menos eficaz a la hora de inhibir la unión del TNF α a sus receptores. De acuerdo con esta última observación, CrmE, que a pesar de unir con alta afinidad el TNF α tanto humano como murino, sólo es capaz de inhibir eficientemente la actividad del hTNF α , presenta en esa posición, el motivo ⁸⁶NRVE⁸⁹. Además, como se discutirá más adelante, el mutante de CrmD_ECTV, Q93A/E95A, resultó en una proteína, Mut5, con una afinidad de un orden de magnitud inferior por mLT α y hTNF α y peor eficiencia en la inhibición de la actividad de estas citoquinas. No se detectó unión de la hLT α al Mut5 mediante SPR. Todo ello sugiere que el motivo ⁹²NQVE⁹⁵ de CrmD tiene cierta importancia en la unión a los ligandos.

En consecuencia, CrmD_ECTV parece ser una proteína mejor diseñada para la inhibición del TNF α que CrmD_CPXV. El hecho de que en el genoma de CPXV existan otros inhibidores del TNF α y de la LT α , ha podido suponer una menor presión evolutiva sobre el gen de CrmD de este virus, al contrario que en el caso del CrmD de ECTV, que como único vTNFR en el genoma del virus, se ha visto obligado a la optimización de su capacidad de inhibición del TNF α y de la LT α .

En el genoma de VARV, un virus humano y ECTV, un virus de ratón, sólo se encuentran los genes de los vTNFRs *CrmB* y *CrmD*, respectivamente. Se observó que CrmB_VARV y CrmD_ECTV tenían una afinidad y actividad comparable frente al hTNF α y el mTNF α . Sin embargo, se detectó una correlación entre la capacidad anti-LT α de estas proteínas y el hospedador del virus que las codifica. Así, mientras que por mLT α , CrmD_ECTV presentó una afinidad 10 veces mayor a la de CrmB_VARV y con un bloqueo de la citotoxicidad mediada por esta citoquina más eficaz, con hLT α se observó exactamente la situación opuesta, teniendo CrmB_VARV una afinidad de un orden de magnitud superior a la de CrmD_ECTV. Esta misma diferencia se encontró comparando CrmD_CPXV con CrmB_CPXV, lo que apunta a que CrmB es una proteína mejor diseñada para la inhibición de la hLT α mientras que CrmD es más eficiente en el bloqueo de la mLT α . El hecho de que VARV y ECTV expresen un vTNFR con mejor capacidad de inhibir la LT α de sus respectivos hospedadores, sugiere que la LT α es una citoquina con una función importante en la defensa frente a poxvirus. El análisis de la virulencia y patogénesis de un ECTV recombinante que exprese CrmC en

lugar de CrmD, podría aportar datos importantes acerca de la importancia de la inhibición de la LT α en el modelo de *mousepox* y en general en las infecciones de poxvirus.

CrmD_ECTV	-----MMKMTPSYILLVYMFVVVSGDV--PYTPINGKCNCTDYNSSNNL---CCK	44
CrmD_CPXV	-----MMNMTPSYILLVYMFVVVSGDV--PYEHINGKCNCTDYNSSNNL---CCK	44
CrmB_VARV	-----MKSVLVLYLFLSCIIINGRDAAPYTPPNKGCKDNEYKRHNL---CCL	45
CrmB_CPXV	-----MKS--YILLLLSCIIIIINSDITPHEPSNGKCKDNEYKRHNL---CCL	43
CrmE_CPXV	-----MTKVIIILGFLIINTNSLSMKCEQG---VSYNSQELK---CCK	38
CrmC_CPXV	-----MDIKNLLTVCTILYISTLVTTADITPSSLPHPVNGSCDDGEYLDKTHN--QCCN	52
TNFR2_HUMAN	-----MAPVAVWAALAVGLELWAAHALPAQVAFTPYAPPGSTCRLREYDQTAQ--MCCS	55
TNFR1_HUMAN	MGLSTVPDLLPLVLLELLVGIYPSGVIGLVPHLGDRKRDVCPQKGIHPQNNISCT	60
Loop de los 50		
CrmD_ECTV	QCNPGRMYTHSCNTTSNT--KCDKCPDDTFTSIPNHSPACLSRCG--KCSSNQVETKSCSN	101
CrmD_CPXV	QCDPGMYTHSCNTTSNT--KCDKCPDGTFTSIPNHIPTCLSRCG--KCSSNHVETKSCSN	101
CrmB_VARV	SCPPGTASRLCDSKTNT--QCTPCGSGTFTSRNNHLPACLSRCG--RCNSNQVETRSCNT	102
CrmB_CPXV	SCPPGTASRLCDSKTNTNTQCTPCASDTFTSRNNHLPACLSRCG--RCDSNQVETRSCNT	102
CrmE_CPXV	LCKPGTYSDHRCDKYSDT--ICGHCPSDTFTSIYNRSPWCHSCRG--SCGTNRVEVTPCTP	95
CrmC_CPXV	RCPPGEFAKIRCSGSDNT--KCERCPPHTTTPVPNYSNGCHQCR--KCPGTFDVKVKTG	108
TNFR2_HUMAN	KCSPGQHAQVFTKTSNT--VCDSCEDSTYQLWNWVPECLSCGS--RCSSDQVETQACTR	112
TNFR1_HUMAN	KCHKGTLYLNDPCPGPD--TDCRECESGFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCT	119
Loop de los 90		
CrmD_ECTV	TQDRVCVCASGYCEFEFGSNG--CRLCVPQTK-----CGSGYGVY--GYS	142
CrmD_CPXV	TQDRVCVCASGYCEFEFGSNG--CRLCVPQTK-----CDSGYGVY--GYS	142
CrmB_VARV	THNRICECSPGYCCLKGSSG--CKACVSQTK-----CGIGYGVY--GHT	143
CrmB_CPXV	THNRICDCAPGYCFLKGSSG--CKACVSQTK-----CGIGYGVY--GHT	143
CrmE_CPXV	TNTRICHDSNSYCLLKASDGN--CVTCAPKTK-----CGRYGK--GED	137
CrmC_CPXV	TQNSKCSCLPGWFCATDSSKTEDCRDCIPKRR-----CPCGYFG--GID	150
TNFR2_HUMAN	EQNRICTRPGWYCALSKQEG--CRLCAPLRK-----CRPGFGVARPQT	154
TNFR1_HUMAN	DRDTVCGGRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCLNGTVHLSQCEKQNTVCTCHAGFFLR--ENE	178
: * * . : : * * : : * * : * * :		
CrmD_ECTV	SKGDVICKKC-----PGNIDKCD--LSFNSIDVEINMYPVNKTSCN-----	181
CrmD_CPXV	SKGDVICKKC-----PGNIDKCD--LSFNSIDVEINMYPVNKTSCN-----	181
CrmB_VARV	SVGDVICSPPCGFTYSHTVSSADKCEPVNNTFNIDVEITLYPVNDTSCTR-----	195
CrmB_CPXV	PTGDVVCSPCGLGTYSHTVSSVDKCEPVNNTFNIDVEINLYPVNDTSCTR-----	195
CrmE_CPXV	EMGNTICKKC-----	147
CrmC_CPXV	ELGNPLCKSC-----	160
TNFR2_HUMAN	ETSDVVCPCAPGTFSTNTSSTDICRPHQICNVVAIPGNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAV	214
TNFR1_HUMAN	CVSCSNCKSLECKLCLPQIENVKGTEDSGTTVLPLVIFFGCLLSLLFLIG-----	231
. * * .		

Figura 52. Comparación de las secuencias de los loops de los 50 y los 90 en receptores del TNF. Alineamiento realizado mediante CLUSTAL/W de las secuencias de aminoácidos de los vTNFRs, CrmD_ECTV (gen E6, cepa Naval, Uniprot/TrEMBL n° O57300), CrmD_CPXV (gen CPXV221, cepa Brighton Red, Uniprot/TrEMBL n° O57079), CrmB_VARV (gen G2R, cepa Bangladesh 1975, Uniprot/TrEMBL n° P34015), CrmB_CPXV (gen CPXV005, cepa Brighton Red, Uniprot/TrEMBL n° Q85308), CrmE_CPXV (gen K3R, especie Elephatpox, Uniprot/TrEMBL n° Q9DJL2) y CrmC_CPXV (gen CPXV191, cepa Brighton Red, Uniprot/TrEMBL n° Q9YP87) y los TNFRs celulares humanos, TNFR2_HUMAN (Uniprot/TrEMBL n° P20333) y TNFR1_HUMAN (Uniprot/TrEMBL n° P19438). Se indican con líneas de colores la longitud de los distintos CRDs de CrmD_ECTV: CRD1 (rojo), CRD2 (verde) y CRD3 (naranja). Con sombreado amarillo se resaltan los aminoácidos que constituyen el "loop de los 50" y el "loop de los 90".

En resumen, CrmC y CrmE expresados por CPXV son inhibidores específicos de mTNF α y hTNF α , respectivamente. CrmD de ECTV es el vTNFR mejor diseñado para inhibir mTNF α y mLt α , mientras que CrmB, permite a VARV bloquear de manera muy eficaz hTNF α y hLT α . Para analizar los determinantes moleculares de la especificidad y afinidad de estos vTNFRs, se realizó un análisis exhaustivo por mutagénesis dirigida de la secuencia de aminoácidos del dominio anti-TNFSFLs de CrmD_ECTV.

A pesar del trabajo sobre la estructura de CrmE (Graham y cols., 2007), no existen evidencias que definan las bases moleculares de la interacción vTNFR-TNF. Como ya se ha comentado, otros trabajos estructurales de complejos TNFSFL-TNFSFR, atribuyeron un papel muy importante al CRD2 y al CRD3 del receptor para la interacción con el ligando. Además, se ha propuesto que el CRD1 resulta de vital relevancia para la oligomerización del receptor celular. Banner y cols. propusieron que la trimerización del TNFR1 inducida por la unión a la LT α desencadena la señalización intracelular (Banner y cols., 1993). Posteriormente, se demostró que el receptor ya existe en forma de trímero antes de unir el ligando. Esta oligomerización tiene lugar gracias a un motivo contenido en el CRD1 denominado PLAD (Chan y cols., 2000). Se ha demostrado también la existencia del PLAD en el TNFR2 y además, se ha propuesto un modelo de agregación de moléculas de TNFR2 en la superficie celular a través del PLAD e inducida tras la unión del ligando que potenciaría exponencialmente la señalización del TNF α (Mukai y cols., 2010). Al igual que un TNFR carente de PLAD

no forma estos agregados en la membrana celular, se ha comprobado que un PLAD soluble, incapaz de unir TNF α , inhibe la señalización al unirse a otras moléculas de receptor evitando la formación de trímeros funcionales (Deng y cols., 2005). Un mecanismo muy similar ha sido propuesto para la inhibición de la apoptosis mediada por el TNFR1 llevada a cabo por el vTNFR de MYXV, M-T2 (Sedger y cols., 2006). Se ha sugerido que M-T2 presenta un dominio PLAD en su CRD1 que le permite interactuar con moléculas de receptor inhibiendo su señalización. Sedger y cols. extendieron esta propiedad y la presencia del motivo PLAD al resto de los vTNFRs, sin embargo, no se han recogido evidencias al respecto. De hecho, el CRD1, como ya discutieron Graham y cols. en su trabajo de la estructura de CrmE, a parte de las cisteínas fundamentales para el mantenimiento de la estructura, guarda un bajo grado de homología en las secuencias de los distintos vTNFRs (Graham y cols., 2007).

En esta Tesis, se mutaron a alaninas los residuos del CRD1 mejor conservados en el Mut1 (K⁴⁴) y Mut8 (D³⁵ y Y³⁶). Los residuos equivalentes en la secuencia del TNFR1 fueron identificados como fundamentales para la función de oligomerización del PLAD (Chan y cols., 2000). Sin embargo, el Mut1 se comportó, tanto a nivel de afinidad como de actividad, de la misma manera que la proteína parental y el Mut8, aunque presentó afinidades de un orden de magnitud inferior a las de CrmD por todas las citoquinas, a altas concentraciones consiguió inhibir el 100% de la citotoxicidad mostrada por cada una de ellas excepto por hLT α a la que no se unió por SPR. Más aún, una cromatografía de exclusión y electroforesis en estado nativo mostraron que el Mut8 tenía las mismas características bioquímicas que CrmD. Por lo tanto, a pesar de cierta pérdida de actividad, el Mut8 no afectó al estado de oligomerización de la proteína. El trabajo de la estructura de CrmE sugiere además, que este vTNFR funciona independientemente de la existencia de un PLAD en el CRD1 y que la importancia de este CRD1 radica en el mantenimiento del plegamiento funcional del CRD2 (Graham y cols., 2007). Así, un mutante carente del CRD1 no perdería actividad anti-TNF α por ser incapaz de oligomerizar sino por la desestructuración del CRD2.

Se encontraron tres mutantes, Mut4, Mut6 y Mut9 que no interactuaron con ninguno de los TNFSFLs probados, mTNF α , hTNF α , mL α y hLT α , mediante SPR. Esta observación se confirmó con los correspondientes experimentos de citotoxicidad en los que estos mutantes no inhibieron el efecto de ninguna de estas citoquinas.

Banner y cols. definieron en la estructura del TNFR1, una región que une el “loop de los 50” con el “loop de los 90” y cuyo correcto plegamiento es esencial para el mantenimiento de la estructura del receptor (Banner y cols., 1993). Esta región se sostiene por dos puentes disulfuro, pero existen también una fenilalanina (F⁶⁰) y un aspártico (D⁹³) muy importantes para la estructura (Figura 53A). El grupo aromático está muy conservado en TNFR2 y los distintos vTNFRs (Figura 52) y su posición cercana al puente disulfuro evita la reducción de este enlace (Figura 53A), además se trata de un residuo bisagra entre el CRD1 y el CRD2 (Figura 53B). El residuo equivalente de CrmD, F⁷² fue mutado a alanina en el Mut9, por lo tanto, se puede adscribir la pérdida completa de la actividad de la proteína a una desorganización estructural más que a la falta de un residuo clave para la interacción con el ligando. De igual manera, el D⁹³ mantiene el plegamiento de esta zona intermedia del TNFR1 mediante dos puentes de hidrógeno con una serina (S⁷⁴) (Figura 53A). Este aspártico se encuentra conservado en CrmD, D¹⁰³ y podría estar llevando a cabo una función estructural similar en la proteína de ECTV y por tanto la falta de actividad del Mut6, en el que el motivo ¹⁰²QDR¹⁰⁴ se cambió por tres alaninas, podría explicarse nuevamente por la desestructuración en esta región.

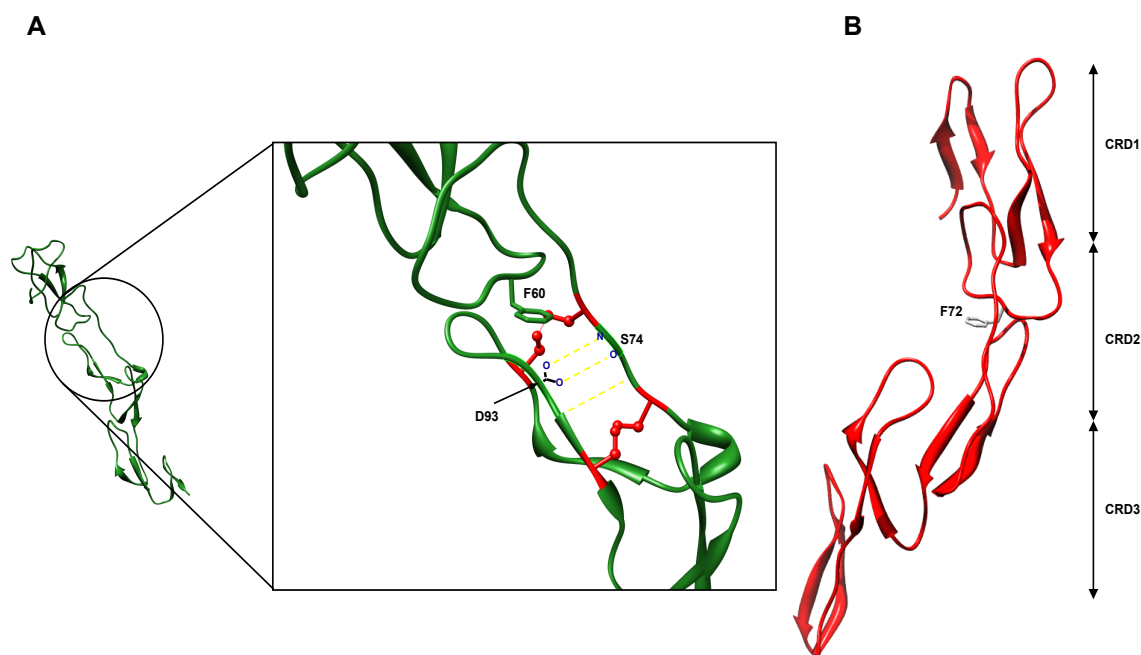


Figura 53. Residuos importantes para el correcto plegamiento de hTNFR1 y CrmD. A) Representación esquemática de la estructura en "lazos" de hTNFR1 (PDB:1TNR). En la ampliación, se muestran sobre la estructura los residuos y enlaces importantes para el correcto plegamiento de la proteína en esta zona: los puentes de hidrógeno (líneas amarillas discontinuas) establecidos entre D⁹³ y S⁷⁴, las cadenas laterales de cuatro cisteínas en "sticks" rojos, implicadas en los puentes disulfuro y la F⁶⁰ en "sticks" verdes. B) Modelo estructural de CrmD en "lazos" sobre el que se resalta la posición central de la F⁷² en "sticks" blancos. Se indican sobre la molécula la posición de cada uno de los CRDs de CrmD.

En el Mut4 se realizó un cambio de una asparagina (N⁷⁷) que se encuentra en el núcleo del "loop de los 50". La mutación N77F dio como resultado una proteína incapaz de interactuar con ninguno de los ligandos estudiados. Sorprendentemente, un mutante similar, el Mut3 (N77A), mantuvo las propiedades anti-mTNF α pero presentó una reducción de su afinidad por hTNF α y mLT α de un orden de magnitud respecto a CrmD. Esta N⁷⁷ de CrmD es uno de los residuos mejor conservados en las secuencias de los vTNFRs y los TNFSFRs (Figura 52), lo que sugiere un papel importante de este residuo en la funcionalidad de estos receptores. De hecho, un mutante equivalente al Mut4 realizado sobre el TNFR1 (N65F) no interactúa con TNF α (Chan y cols., 2000). La estructura del complejo LT α -TNFR1 reveló dos residuos en la secuencia de la LT α claves para la interacción con el receptor Y¹⁰⁸ y D⁵⁰. La Y¹⁰⁸ se encuentra muy conservada en las formas humanas y murinas de la LT α y el TNF α (Y⁸⁷), orientándose hacia el núcleo del "loop de los 50" del receptor, donde en el caso del TNFR1, es estabilizada por la H⁶⁹ e interacciones hidrofóbicas (Banner y cols., 1993). La H⁶⁹ no está conservada en TNFR2 que presenta en esa posición un glutámico (E⁷⁰) cuya cadena lateral contacta con la R³¹ del TNF α , un residuo que no es importante en el caso de la interacción con el TNFR1 (Mukai y cols., 2010). Por su parte, CrmD y otros vTNFRs presentan un residuo hidrofóbico en la posición equivalente a la H⁶⁹ del TNFR1 (Figura 52), lo que sugiere, para esta región, un mecanismo de interacción distinto con sus ligandos a la llevada a cabo por los receptores celulares. La incorporación en el Mut4 de un residuo aromático en la zona en la que se integra la tirosina conservada del ligando (Y^{87/108}) puede estar causando un impedimento estérico que evite la unión del ligando (Figura 54). El hecho de que el Mut3 pierda gran parte de su actividad anti-hTNF α y anti-mLT α indica que para la unión de esta citoquina la N⁷⁷ tiene un papel importante en la correcta orientación y estabilidad de la Y^{87/108} en la estructura del complejo. Además, la mutación de dos residuos próximos a la N⁷⁷ en el loop, H78A/S79A dio como resultado una proteína (Mut10) con sus capacidades de interacción intactas. Por lo tanto, mientras que en el TNFR1 la Y^{87/108} es estabilizada por la H⁶⁹, en CrmD parece ser la N⁷⁷ la que juega este papel respecto al hTNF α y la mLT α , aunque en el caso del mTNF α se requiere además un fuerte impedimento estérico en esta zona para destruir la interacción con CrmD.

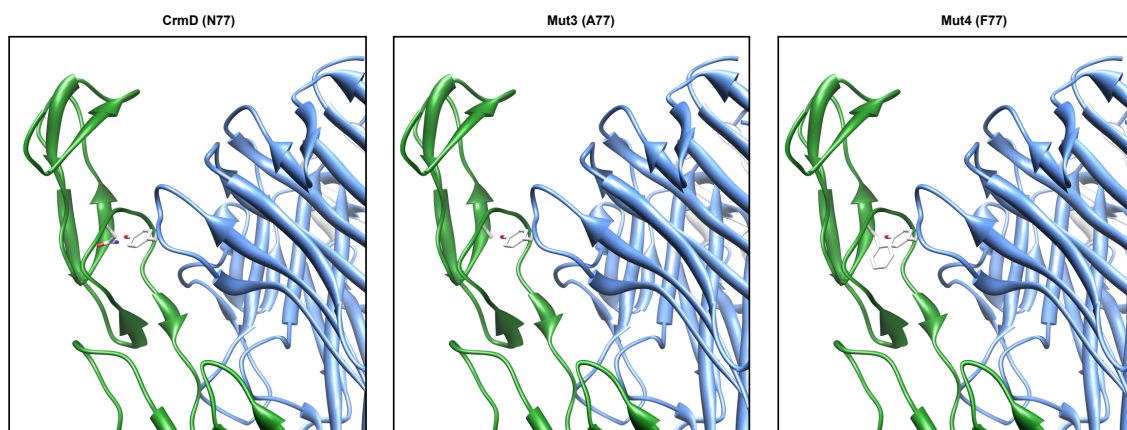


Figura 54. Modelos estructurales para la unión de las proteínas CrmD, Mut3 y Mut4, al hTNF α . Las estructuras de las proteínas se representan en "lazos" verdes y la del hTNF α en azul. En "sticks" blancos se resalta la posición de la Y87 del hTNF α en relación al residuo correspondiente en cada caso (CrmD:N77, Mut3:A77 y Mut4:F77) también en "sticks" blancos.

La estructura de los complejos LT α -TNFR1 (Banner y cols., 1993) y TNF α -TNFR2 (Mukai y cols., 2010) revelaron la existencia de diferencias significativas en la unión llevada a cabo por cada uno de los receptores. Estudios de mutagénesis dirigida del TNFR1 determinaron dos *loops* (K⁷⁸-G⁸¹; S¹⁰⁸-L¹¹¹) muy importantes para la interacción con el TNF α (Loetscher y cols., 1993; Mukai y cols., 2009). Estos *loops* se encuentran separados por una arginina (R⁷⁷) esencial, en el TNFR1, para establecer contactos con los residuos D¹⁴³ y Q¹⁴⁹ del TNF α (Mukai y cols., 2010). La R⁷⁷ está conservada en el TNFR2 pero su disposición es completamente distinta en este receptor. De hecho, la función de la R⁷⁷ es llevada a cabo por la R¹¹³ en el TNFR2. Estos dos residuos básicos se encuentran conservados en CrmD, K⁸⁸ y R¹²⁴. El Mut11 de CrmD (R86A/K88A) mostró la misma afinidad por la LT α y TNF α que la proteína parental, lo que demuestra, que como en el TNFR2, el residuo K⁸⁸ (R⁷⁷ en TNFR2) no tiene implicación directa en los contactos de CrmD con el ligando. Por lo tanto, la R¹²⁴ de CrmD, residuo no mutado en nuestro análisis, podría ser la responsable de estabilizar los aminoácidos D¹⁴³ y Q¹⁴⁹ del TNF α . De hecho, estudios realizados en nuestro laboratorio, indican que el D¹⁴³ del TNF α es un residuo esencial para la interacción con CrmD y no así con CrmE en cuya secuencia no existe un residuo conservado que pueda llevar a cabo la función de la R¹¹³ del TNFR2 como la R¹²⁴ de CrmD (A. Oates, G. Winter y A. Alcamí, resultados no publicados).

El *loop* K⁷⁸-G⁸¹ del TNFR1 es fundamental en la interacción con TNF α al establecer contactos de Van de Waals a lo largo del *loop* 143-149 del ligando (Mukai y cols., 2010). Este tipo de interacción se observó también en el caso del complejo LT α -TNFR1 (Banner y cols., 1993). El *loop* K⁷⁸-G⁸¹ del TNFR1 se integra perfectamente en la superficie del TNF α , sin embargo, el *loop* equivalente en el TNFR2, S⁷⁹-D⁸¹, es mucho más corto y no se adentra en la superficie del ligando (Mukai y cols., 2010). CrmD al igual que el TNFR2, presenta en esta zona un *loop* corto S⁹⁰-N⁹², con lo que sería esperable que estos residuos no tuviesen gran importancia en la unión al ligando. De acuerdo con esta observación, el Mut12, S90A/S91A, mantuvo la actividad de la proteína parental frente a todos los ligandos probados, a excepción de la pérdida de un orden de magnitud en la afinidad por mTNF α . A pesar de esta diferencia en la afinidad por el mTNF α , el Mut12 inhibió la citotoxicidad inducida por el mTNF α de manera comparable a CrmD.

Como se ha mostrado anteriormente, la LT α marca las diferencias de especificidad entre CrmB y CrmD. Así, CrmD, una proteína de un virus de ratón, inhibe más eficientemente la mLT α , mientras que CrmB, codificada por un virus humano, presenta mejor afinidad por la hLT α . Esto indica la existencia de determinantes moleculares que predisponen para una unión más eficaz en una u otra proteína. Se generó un mutante de CrmD, Mut13 (E116A/F117A/E118A) que manifestó una ganancia de afinidad y de actividad frente a la hLT α respecto a la proteína parental CrmD. Comparando las secuencias de proteínas que inhiben eficazmente la hLT α como el hTNFR2 o CrmB, encontramos que los residuos altamente electronegativos y de gran peso molecular en esa región de CrmD, se cambian por aminoácidos pequeños y con carácter básico (CrmB: L¹¹⁵, L¹¹⁶, K¹¹⁷; hTNFR2: A¹⁰⁵, L¹⁰⁶, S¹⁰⁷, K¹⁰⁸) (Figura 52).

Además la región equivalente en el TNFR1 es una de las zonas del receptor más importantes en el complejo LT α -TNFR1 al interactuar con un motivo hidrofóbico del ligando en el que el residuo más implicado es la Y⁹⁶ (Banner y cols., 1993). Estos datos sugieren que la F¹¹⁷ de CrmD podría estar provocando un impedimento estérico con la Y⁹⁶ de tal manera que al cambiarla por alanina en el Mut13 se consigue que la proteína pueda interactuar con la hLT α . Sin embargo, al mismo tiempo, esa mutación reduce la afinidad de la proteína por el hTNF α en un orden de magnitud, lo que se traduce en una pérdida significativa de la capacidad de inhibir el hTNF α . Así, el motivo ¹¹⁶EFE¹¹⁸ de CrmD que parece evitar la inhibición de la hLT α puede tener un papel en la interacción con hTNF α . Sin embargo, al sustituir el motivo ¹¹⁵LLK¹¹⁷ de CrmB por el ¹¹⁶EFE¹¹⁸ de CrmD se obtuvo una proteína mutante de CrmB incapaz de inhibir la citotoxicidad mediada por el hTNF α (resultados no mostrados). Este resultado sugiere que CrmD y CrmB llevan a cabo estrategias moleculares distintas para interactuar con sus respectivos ligandos.

Los mutantes Mut5, Mut7 y Mut14 presentaron un comportamiento muy similar en los ensayos utilizados. Estas proteínas mantuvieron intacta la capacidad de unir el mTNF α , sin embargo, su afinidad por hTNF α , mLT α y hLT α disminuyó en un orden de magnitud en comparación con CrmD. En algunos casos además, esa baja afinidad se tradujo en la capacidad de inhibir la citotoxicidad mediada por estas citoquinas, como sucedió con el Mut5 y el Mut7 en los experimentos de hTNF α . En el Mut5 se cambiaron por alaninas los residuos Q⁹³ y E⁹⁵, aminoácidos de un motivo ⁹³QVE⁹⁵ muy conservado en todos los receptores del hTNF α (Figura 52). CrmC, sin embargo, que no inhibe la citotoxicidad mediada por el hTNF α presenta en esta posición un motivo SFD. Estos datos sugieren que los residuos del motivo ⁹³QVE⁹⁵ de CrmD podrían tener relevancia para la unión al hTNF α pero ser prescindibles en la interacción con el mTNF α .

En resumen, nuestro análisis por mutagénesis de la proteína CrmD ha permitido identificar que este vTNFR de ECTV presenta una estructura y una forma de unión a sus ligandos más parecida a la del TNFR2 que al TNFR1, algo que ya se sugirió para los vTNFRs gracias a la estructura de CrmE (Graham y cols., 2007). Sin embargo, existen pequeñas diferencias entre CrmD y el TNFR2. Con el complejo TNF α -TNFR2 se definieron dos zonas del receptor fundamentales para interactuar con el ligando, una región de carácter ácido en el CRD2 y una zona básica en el CRD3 (Mukai y cols., 2010). Si bien la zona del CRD3, en la que la R¹¹³ del TNFR2 establece contactos con el TNF α , está parcialmente conservada en CrmD (R¹²⁴), la región ácida del CRD2 no se mantiene en CrmD. En esta zona ácida del TNFR2, D⁵⁴, E⁵⁷ y E⁷⁰ proporcionan el entorno adecuado para unirse a la R³¹ y la R³² del TNF α . Sin embargo, CrmD presenta un motivo D⁴⁵, P⁴⁸ y A⁵⁹ que difícilmente puede estabilizar los residuos básicos del ligando. De hecho, un estudio de mutagénesis dirigida sobre el TNF α realizado en nuestro laboratorio reveló que la R³¹, esencial para la unión del TNFR2, era prescindible en la interacción de CrmD, mientras que sí se necesitaba de la R³², posiblemente por su enlace con el D⁴⁵ de CrmD. Más aún, se ha visto que la mutación R32A en hTNF α supone un aumento en la afinidad de CrmE (A. Oates, G. Winter y A. Alcamí, resultados no publicados). Todo esto indica que los vTNFRs, a pesar de su gran similitud con el TNFR2, primero, llevan a cabo la interacción con los ligandos de una manera que les permita competir la unión del ligando a su receptor celular y segundo, que cada vTNFR tiene unas propiedades moleculares específicas para bloquear con mayor eficacia aquellas citoquinas que el virus se va a encontrar en sus hospedadores. El estudio estructural de complejos vTNFR-TNFSFL podría revelar las claves por las que estas proteínas virales, utilizando estrategias distintas a las conocidas para los TNFSFRs, puedan unir sus ligandos con tan alta afinidad. De esos análisis, además, se podría conseguir valiosa información que ayudase a diseñar mejores fármacos anti-TNF α y de especificidad dirigida.

5.3 Las dos actividades inmunomoduladoras de CrmD, anti-TNF y anti-CKs, son esenciales para la patogénesis de ECTV.

ECTV causa en ratones susceptibles como BALB/c una enfermedad aguda, *mousepox*, con una DL_{50} próxima a 1 ufp y una patogénesis muy similar a la que provocaba, VARV, en humanos (Esteban y Buller, 2005). Por ello, este modelo ha sido ampliamente utilizado para comprender los mecanismos de infección de los poxvirus. Además, las estrategias de inmunomodulación llevadas a cabo por ECTV y VARV son muy similares, con lo que *mousepox* constituye un buen modelo para el estudio de los genes con funciones en la evasión inmunológica de VARV.

En ausencia de estos genes inmunomodulares, ECTV replica de manera eficaz *in vitro*, pero pueden resultar fundamentales para garantizar el éxito de la infección en el animal. Por ejemplo, un ECTV cepa Moscú recombinante carente del gen *E166*, que codifica para la proteína inhibidora del IFN de tipo I, vIFN-IBP, se comporta como un virus prácticamente inocuo, mostrando una DL_{50} superior a 10^7 ufp (Xu y cols., 2008).

Como se ha demostrado, la proteína CrmD es un eficaz inhibidor del mTNF α y la mLT α y, además, gracias a su dominio SECRET, es capaz de interactuar con gran afinidad con un pequeño grupo de CKs inhibiendo la actividad *in vitro* de algunas de ellas como mCCL27, mCXCL13 o mCCL25. En esta Tesis, se han confirmado las observaciones previas existentes en el laboratorio que mostraban que CrmD es una proteína fundamental para la patogénesis de ECTV. El virus deficiente en esta proteína, ECTV Δ CrmD, es un virus altamente atenuado con una DL_{50} superior a 1×10^7 ufp, una virulencia comparable a la del virus recombinante ECTV Δ vIFN-IBP. Así como la atenuación del virus ECTV Δ vIFN-IBP podía ser esperable, dada la conocida relevancia del IFN de tipo I en la respuesta anti-viral, es sorprendente que la eliminación de un inhibidor del TNF α del genoma de ECTV tenga un efecto tan drástico sobre la virulencia de este virus. Hasta la fecha, ningún otro virus recombinante delecionado de algún otro gen con funciones inmunomoduladoras ha supuesto una pérdida de virulencia comparable a la de estas dos proteínas, lo que sugiere que la vIFN-IBP y CrmD podrían ser buenas dianas para el diseño de vacunas y tratamientos frente a *mousepox*. De hecho, ratones susceptibles fueron inmunizados frente a la enfermedad al administrarles vIFN-IBP purificada (Xu y cols., 2008). Además, también se consiguió proteger de la enfermedad mediante anticuerpos neutralizantes específicos contra la vIFN-IBP (Xu y cols., 2012). VARV contiene en su genoma, genes que codifican proteínas para la inhibición del IFN-I y el TNF α , B17 y CrmB, respectivamente. La inmunización con estas proteínas o el bloqueo de su actividad, podría resultar un tratamiento efectivo para la viruela o para otras infecciones de poxvirus en humanos como *monkeypox*.

Los virus recombinantes ECTV RevCRDs y ECTV RevSECRET permitieron estudiar la aportación de cada uno de los dominios de CrmD a la patogénesis de ECTV. El virus ECTV RevSECRET se construyó a partir del mutante puntual de la proteína CrmD, Mut4, que carece actividad anti-TNFSFLs pero conserva sus funciones anti-CK. Así, se obtuvo un virus que codificaba una proteína CrmD completa en la que sólo el dominio SECRET era funcional. ECTV RevSECRET se comportó como un virus altamente atenuado con una DL_{50} comparable a la del virus ECTV Δ CrmD ($> 1 \times 10^6$ ufp). Una atenuación sorprendente dada la escasa manipulación genómica que se realizó para obtener el virus ECTV RevSECRET, en el que de las 207 kb del genoma de ECTV cepa Naval sólo se modificaron dos pares de bases, las necesarias para generar el cambio N77F en el gen *E6* que codifica para CrmD.

El fenotipo atenuado de ECTV RevSECRET sugiere que la inhibición del TNF llevada a cabo por los CRDs de CrmD es esencial para la patogénesis de ECTV. Sin embargo, el virus ECTV RevCRDs que expresa una versión truncada de CrmD capaz de inhibir el TNF α pero sin actividad anti-CK, fue también un virus muy atenuado ($DL_{50}=1 \times 10^5$ ufp). Por lo tanto, ambos dominios son necesarios pero no suficientes para que CrmD permita a ECTV evadir eficientemente la respuesta inmunológica del ratón. De hecho, la infección conjunta de ECTV RevCRDs y ECTV RevSECRET en un grupo de animales, resultó más letal que la inoculación de estos virus por separado (resultados no mostrados).

Cuando se inoculan ratones resistentes B6 a través de la pata con ECTV, a los 5-6 días postinfección aparece una fuerte inflamación en la almohadilla plantar inoculada (resultados no mostrados). Sin embargo, en los ratones susceptibles BALB/c inoculados con ECTV RevCrmD nunca se observó dicha inflamación, que sí se detectó cuando se infectaron los ratones con el virus atenuado ECTV Δ CrmD. Cortes histológicos mostraron un claro infiltrado linfocitario en esa zona a los 7 días postinfección, lo que sugiere que se está dando un reclutamiento activo de células inmunológicas al sitio de infección (resultados no mostrados). Esto es un signo de la diferencia entre las respuestas inmunológicas inducidas en una y otra cepa de ratón, mientras que en BALB/c, ECTV es capaz de controlar la respuesta del hospedador, la fuerte respuesta celular con altos niveles de citoquinas Th1, característica de los ratones B6, supera a los mecanismos inmunomoduladores del virus.

Al infectar los animales con ECTV RevCRDs también se observó inflamación de la pata inoculada, lo que indica que la función anti-CK del dominio SECRET es esencial para que CrmD desarrolle su actividad anti-inflamatoria completamente. Sin embargo, el virus ECTV RevSECRET tampoco bloqueó la inflamación y de hecho, a dosis altas (10^5 ufp), las patas de los ratones infectados con el virus ECTV RevCRDs se inflamaron menos y más tarde que los inoculados con ECTV RevSECRET. Esto sugiere que el bloqueo del TNF α frena gran parte de la respuesta inflamatoria, lo cual está de acuerdo, con el hecho de que el TNF α es capaz de inducir la secreción de un gran número de CKs (Viejo-Borbolla y cols., 2010a) y otros factores proinflamatorios. Sin embargo, a dosis altas se observa una significativa reducción de la inflamación en los ratones inoculados con ECTV RevSECRET en comparación con el grupo de ECTV Δ CrmD, lo que indica que el dominio SECRET, por si solo, es capaz de frenar la respuesta inflamatoria. Por lo tanto, parece que CrmD inhibe el TNF α evitando la producción de CKs, y en el caso de que su actividad anti-TNF α no controle la respuesta inflamatoria, el dominio SECRET ayudaría contrarrestando la función quimiotáctica de las CKs. Por ello, ambos dominios son necesarios en la patogénesis de ECTV.

Cuando se inocula ECTV a través de la almohadilla plantar de la pata del ratón, el virus llega rápidamente a los ganglios poplíteos que drenan la zona. A las 48h postinfección se produce un pico en la actividad de las células NK con el objetivo de frenar el avance del virus (Parker y cols., 2007). Esta respuesta NK es esencial para superar la enfermedad, no en vano, ratones resistentes B6 se vuelven susceptibles cuando se deplecionan de este tipo celular (Parker y cols., 2007). Sin embargo, tras los primeros cuatro días de la infección, cuando el virus ya ha llegado al bazo y al hígado, las células NK son completamente prescindibles y es la respuesta de las células CD8+ la que toma el protagonismo en la respuesta frente al virus con un pico de actividad a los 7 días postinfección (Fang y cols., 2008). Si el virus supera la respuesta CTL en estos órganos, producirá una necrosis tisular que acaba provocando la muerte del hospedador. Por ello, la respuesta NK y CTL son claros objetivos de los mecanismos inmunomoduladores de ECTV.

Se observó que a las 48h postinfección, los ratones infectados con ECTV Δ CrmD presentaban una gran activación de las células NK en los ganglios. Sin embargo, la presencia de CrmD redujo a la mitad esta activación de células NK. Se sabe que esa fuerte respuesta NK a las 48h postinfección se debe a un reclutamiento activo (Fang y cols., 2008) gracias a CKs como CXCL9, CXCL10 y CXCL11 (Martin-Fontecha y cols., 2004) y en menor medida, CCL21 o CCL19 (Ferlazzo y cols., 2004). De estas CKs, sólo CXCL11 es un ligando de CrmD y, de acuerdo con esto, no se observaron diferencias en los porcentajes de células NK en uno u otro grupo. En los animales inoculados con ECTV RevSECRET se observó una actividad NK comparable a la del grupo del virus de delección, sin embargo, ECTV RevCRDs también bloqueó la activación de las células NK de manera comparable a ECTV RevCrmD. Esto sugiere que la actividad anti-TNFSFLs de CrmD está evitando la activación efectiva de las células NK. Esta reducción de la respuesta NK podría permitir a ECTV RevCRDs y ECTV RevCrmD alcanzar mayor título en el bazo a día 7 postinfección.

Las células NK pueden activarse de manera específica mediante la interacción de ciertos receptores activadores con sus ligandos o de manera inespecífica por medio de citoquinas como la IL-12. Ante ciertas infecciones como las producidas por el citomegalovirus murino o el virus herpes simplex, se sabe que las células NK son activadas por mecanismos específicos e inespecíficos, respectivamente (Dokun y cols., 2001; Duerst y Morrison, 2003). En el caso de los poxvirus, la activación de las células NK se da por la conjunción

de ambos procesos, como sugieren algunos modelos de VACV (Brooks y cols., 2006; Chisholm y Reyburn, 2006). Algunos receptores activadores de células NK como NKG2D o el heterodímero CD94–NKG2E, funcionan sinérgicamente en el efecto citotóxico ante las células infectadas, sin embargo, aunque su delección en ratones B6 conlleva a un fenotipo susceptible a ECTV, las células NK carentes de estos receptores son igualmente reclutadas a los ganglios y activadas (Fang y cols., 2011). Esto sugiere que existe algún otro receptor que compensa la delección o que las células NK pueden activarse inespecíficamente. Es a este nivel donde CrmD puede estar bloqueando la activación de las células NK. La inhibición del TNF α por parte de CrmD podría evitar la inducción de algunas citoquinas, como la IL-12, cruciales para la actividad NK.

Por otro lado, hemos demostrado que CrmD puede interactuar con el tmTNF α bloqueando su actividad citotóxica *in vitro*. Además, la interacción CrmD–tmTNF α no sólo tiene efectos sobre la función como ligando del tmTNF α , sino que también puede inducir una señalización reversa distinta a la de los receptores celulares. Se ha demostrado que la interacción del TNFR1 con el tmTNF α potencia la actividad citotóxica de la línea celular NK, NK-92 (Yu y cols., 2009). En esta Tesis se ha visto que esa misma interacción induce la producción de TNF α en la línea celular de macrófagos RAW264.7, sin embargo, CrmD redujo los niveles de TNF α en el sobrenadante. Esta capacidad de inducir señalización reversa a través de citoquinas de superficie también se ha observado para la proteína vCD30 de ECTV (Saraiva y cols., 2002).

Se sabe que el tmTNF α es un componente fundamental en la sinapsis inmunológica establecida entre células NK y células dendríticas (Xu y cols., 2007a). Gracias a la interacción del tmTNF α de las células dendríticas con el TNFR2 de las células NK se induce la expresión de MHC y de IL-12 en las células dendríticas y perforina e IFN- γ en las células NK. Anticuerpos monoclonales frente a TNF α y TNFR2, pero no frente a TNFR1, redujeron la producción de IFN- γ por parte de las células NK (Xu y cols., 2007a). Por tanto, es posible que en el contexto de la infección, CrmD esté interfiriendo con la sinapsis NK–células dendríticas inhibiendo la activación de las células NK en el ganglio los primeros días de infección. Además, la señalización reversa a través del tmTNF α expresado en la superficie de células NK podría inhibir la producción de citoquinas de tipo Th1. Sería interesante investigar si la unión de CrmD con tmTNF α puede inducir también la liberación de citoquinas de tipo Th2 para desbalancear la respuesta, como ocurre en el caso de la interacción vCD30–CD30L (Saraiva y cols., 2002). La importancia del tmTNF α en la defensa frente a poxvirus está también resaltada por el hecho de que ratones B6 deficientes en TNFR2 fueron muy susceptibles a la infección por ECTV. Sin embargo, los ratones carentes del TNFR1 fueron igualmente resistentes (Ruby y cols., 1997). A pesar de que el TNFR2 puede interactuar con el TNF α soluble, se postula que en esa situación la función principal del TNFR2 es la de aumentar la concentración del ligando en torno al TNFR1 y que el principal ligando del TNFR2 es el tmTNF α (Grell y cols., 1995). Estas observaciones justifican que los vTNFRs hayan adoptado una conformación más similar a la del TNFR2 y quizás uno de los objetivos de estos inhibidores virales sea el tmTNF α .

La baja activación de las células NK en los ganglios permite a ECTV RevCrmD y ECTV RevCRDs alcanzar el bazo y, presumiblemente el hígado, con mayores títulos que ECTV RevSECRET y ECTV Δ CrmD. Sin embargo, para cuando el virus ha alcanzado estos órganos, las funciones efectoras de las células NK y por tanto su control viral, han dejado de ser relevantes. A los 7 días postinfección una fuerte y eficaz respuesta CTL de las células CD8+ es fundamental en la defensa frente a la infección (Chaudhri y cols., 2004). Sin embargo, para entonces, ECTV RevCrmD ha superado esa respuesta del hospedador causando una necrosis en todo el órgano en el que ya no se aprecian restos de células CD8+ vivas. En cambio, en los ratones infectados con ECTV RevCRDs no sólo se observó un número de células CD8+ comparable a la de los animales inoculados con ECTV Δ CrmD y ECTV RevSECRET, sino que además esta población linfocitaria estaba fuertemente activada en los tres casos. Esto sugiere que ante la acción de los CTL en el bazo, la actividad del dominio anti-TNF α no es suficiente para contrarrestar la respuesta y que el virus necesita de la actividad del dominio SECRET. La actividad anti-CKs de este dominio podría estar implicada en el bloqueo de la llegada al bazo de algún tipo celular, como macrófagos, que pudiesen activar la respuesta CD8+.

La mCXCL13 es un quimioatrayente de los linfocitos B muy presentes en el bazo y además su actividad es inhibida *in vitro* por CrmD. La inhibición de esta CK por CrmD podría estar impidiendo los contactos linfocitos B-CD8+ que podrían potenciar la respuesta CTL. De acuerdo con esto, se ha observado una reducción de la respuesta CTL en ratones B6 deplecionados de linfocitos B (Fang y Sigal, 2005). Estas hipótesis chocan con el hecho de que el ECTV RevSECRET no reduzca la activación de las células CD8+ en el bazo. Esto podría deberse a un requerimiento de inhibir conjuntamente el TNF α y las CKs para controlar eficientemente la respuesta, o a que la baja carga viral de este virus recombinante, que llega al bazo tras la acción de las células NK en los ganglios, permita al organismo superar la infección en los órganos diana del virus.

En resumen y resaltando la actividad inmunomoduladora de CrmD a lo largo de la evolución de la infección en *mousepox*, podemos proponer un modelo preliminar pero que asienta las bases para futuras investigaciones. Se ha determinado que al infectar ratones con VACV por vía subcutánea, las primeras poblaciones en reaccionar y llegar al sitio de infección son los fagocitos (Fischer y cols., 2011). Sería interesante determinar si este reclutamiento de neutrófilos y macrófagos sucede con ECTV y si está inhibido por la acción de CrmD. Mediante un mecanismo similar al discutido para la inhibición de las células NK en los ganglios y demostrado para la línea de macrófagos murinos, RAW264.7, CrmD podría reducir la actividad de los macrófagos mediante su interacción con el tmTNF α . Además, el TNF α es una de las principales moléculas efectoras de las funciones de los macrófagos en el sistema inmunológico. Sería interesante evaluar si los distintos virus recombinantes alcanzan los ganglios poplíteos con el mismo título. Una vez en los ganglios y cuando la actividad de las células NK es más relevante, CrmD, por su actividad anti-TNF α inhibe las funciones efectoras de las células NK permitiendo al virus alcanzar los órganos dianas con un gran título viral. Por el contrario, los virus carentes de esta actividad inmunomoduladora quedan mermados por la acción de las células NK y expuestos a la acción de las células CD8+ en el bazo a los 7 días postinfección. Así, ECTV RevCrmD y ECTV RevCRDs llegan al bazo con un título comparablemente alto, pero ante la respuesta CTL la acción anti-TNF α de la versión truncada de CrmD no es suficiente para contrarrestar la defensa. La posible actividad del SECRET inhibiendo la llegada o el movimiento de algún tipo celular para la activación de las células CD8+ podría permitir a ECTV RevCrmD evadir la respuesta en el bazo mientras que ECTV RevCRDs es eliminado por la defensa adaptativa. Aunque en el bazo se pone de manifiesto la importancia de la actividad del dominio SECRET, sería importante determinar la razón por la que este dominio resulta tan esencial en este momento de la infección. El rastreo por citometría de flujo de alguna población celular que regule la respuesta CTL en el bazo, o la infección con ECTV RevSECRET de ratones deficientes en TNF α podrían ser buenas herramientas para esclarecer la función de este dominio.

Los datos obtenidos aportan al dominio SECRET una gran importancia en la evasión del sistema inmunológico llevada a cabo por CrmD en *mousepox*. Siempre en un contexto de infección en el que el TNF α esté inhibido. La eliminación de este dominio, da como resultado un ECTV RevCRDs con una atenuación de 5 órdenes de magnitud respecto a ECTV RevCrmD. Dado que ECTV expresa otras proteínas con capacidades anti-CKs (A41, vCCI, SCP2 y SCP3), resulta sorprendente que la eliminación de un dominio que sólo bloquea un pequeño grupo de CKs, tenga un efecto tan drástico sobre la virulencia de ECTV. La delección de otras vCKBPs en modelos de poxvirus, como A41 en VACV (Ng y cols., 2001) o SCP2 y 3 en ECTV (A. Viejo-Borbolla, A. Alejo y A. Alcamí, resultados no publicados) apenas tuvo incidencia sobre la virulencia. Por ello, se podría esperar que la adición de este dominio anti-CKs a una proteína con actividad anti-TNF α podría suponer una ventaja sustancial para el virus. De hecho, la infección de ratones con los virus ECTV RevCRDs y ECTV RevSECRET simultáneamente, resultó en un fenotipo atenuado en comparación con ECTV RevCrmD (resultados no mostrados), indicando que ambas actividades, anti-TNF α y anti-CKs, deben estar concentradas en la misma molécula. La acción del dominio SECRET parece tener que ver con la función anti-TNF α de CrmD pero no se observó una cooperatividad positiva en la unión de los distintivos ligandos y ambos dominios son estructural y funcionalmente independientes.

Sin embargo, hemos descubierto que el dominio SECRET es capaz de interactuar con GAGs de superficie con gran afinidad. Además, gracias a esta nueva función del dominio SECRET, CrmD puede inhibir la acción del TNF α en la membrana celular, próximo a los receptores de la citoquina. Esta propiedad del dominio

SECRET podría explicar la atenuación observada para el virus ECTV RevCRDs. Mediante la interacción con GAGs, CrmD no sólo podría conseguir aumentar su estabilidad *in vivo*, sino que también le permitiría aumentar su concentración en torno a los TNFRs celulares y permanecer retenida en la zona de la infección. Al mismo tiempo, su gran afinidad por los GAGs le podrían permitir a CrmD desplazar a las CKs de las superficies impidiendo la formación de los gradientes quimiotácticos, una estrategia utilizada, por ejemplo, por la proteína A41 para interferir con las funciones de las CKs (Ruiz-Arguello y cols., 2008).

Para confirmar si la unión a GAGs es la principal aportación del dominio SECRET a las funciones de CrmD, sería interesante generar un ECTV recombinante que expresase una proteína CrmD completa y funcional pero que no interaccionase con GAGs. Como primer paso a esta aproximación, hemos definido algunos residuos en la secuencia del dominio SECRET importantes para la unión a GAGs, K²⁴⁵, R²⁵⁰ y R²⁵³. A pesar de que la secuencia de aminoácidos no revela un claro dominio de interacción con GAGs, como los observados en otras proteínas inmunomoduladoras de poxvirus como B18 (Montanuy y cols., 2011) o A41 (Ruiz-Arguello y cols., 2008), en la estructura tridimensional del dominio SECRET, estos tres residuos básicos se agrupan formando un motivo de unión a GAGs. Este motivo queda además en la cara opuesta de los residuos importantes para la unión de CKs, con lo que sería compatible con una triple interacción de CrmD con TNF α , CKs y GAGs (Figura 55).

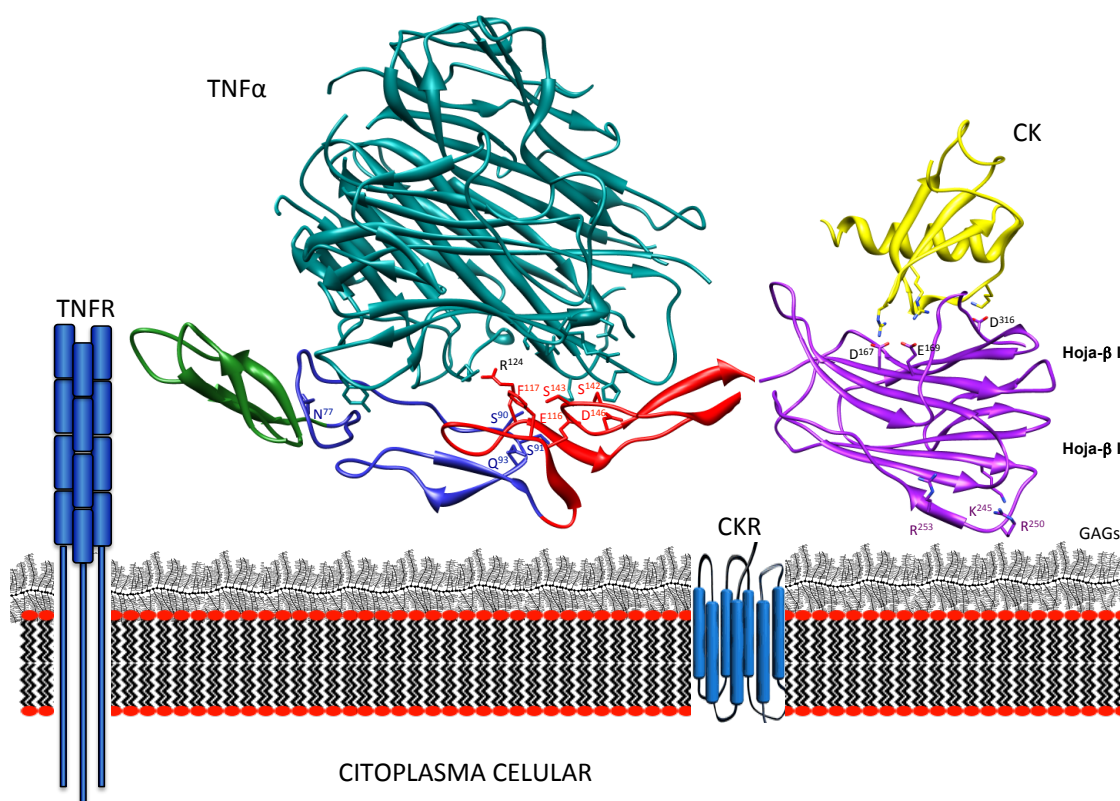


Figura 55. Modelo molecular de la interacción de CrmD con TNF α , CKs y GAGs. Representación en "lazos" de un hipotético complejo de CrmD con TNF α (cian), CK (amarillo) y GAGs. Los distintos CRDs del dominio de unión a TNF α de CrmD se representan en distintos colores (CRD1 (verde), CRD2 (azul) y CRD3 (rojo)) y el dominio SECRET en morado. Se representan en "sticks", residuos implicados en algún tipo de interacción. Algunos de los aminoácidos, analizados en esta Tesis mediante mutagénesis, se etiquetan en el color correspondiente a su localización en la proteína. Se muestran también las etiquetas en negro de otros residuos que han sido descritos como importantes para la interacción con CKs (D¹⁶⁷, E¹⁶⁹ y D³¹⁶) y TNF α (R¹²⁴), pero que no han sido analizados en esta Tesis.

Englobando todos los resultados moleculares obtenidos, proponemos un modelo según el cual, CrmD unido a GAGs podría formar un complejo en la superficie celular con el TNF α y las CKs, evitando así su interacción con los receptores celulares (Figura 55). Xue y cols., describieron que el dominio SECRET, a través de residuos ácidos situados en la hoja- β I, bloquea residuos de la CK importantes para su interacción con GAGs (Figura 55) (Xue y cols., 2011). Sin embargo, la disposición de la proteína en el complejo, esconde

residuos de la CK importantes para la interacción con el CKR. Esto está de acuerdo con la inhibición de la actividad de las CKs *in vitro* observada para el dominio SECRET. Hemos definido 3 aminoácidos importantes para la unión de CrmD a GAGs, K²⁴⁵, R²⁵⁰ y R²⁵³, que como se puede ver en la Figura 55, se encuentran agrupados en la cara opuesta (hoja-β II) a la interfase con la CK. En la Figura 55 se muestra también un modelo para la interacción de CrmD con el TNFα. En este modelo, se indican los residuos cuya mutación resultó en una proteína con menor afinidad por el TNFα y que por tanto, podrían jugar un papel importante en la interacción con el ligando. Hemos encontrado, que el aminoácido N⁷⁷ de CrmD, enfrentado a una tirosina del ligando (Figura 55), es fundamental en la unión de la proteína a TNFSFLs. Otros residuos como la F¹¹⁷ parecen modular la especificidad de la interacción. Sin embargo, la estructura tridimensional del complejo CrmD con distintos TNFSFLs, podría confirmar el modelo de interacción de CrmD sugerido por nuestro análisis de mutagénesis.

Hemos visto que el dominio SECRET es un dominio de la proteína CrmD, fundamental para la patogénesis de ECTV. Este dominio desempeña dos funciones importantes, el bloqueo de la actividad de algunas CKs y la retención en las superficies celulares gracias a su interacción con GAGs. La generación de nuevos virus recombinantes de ECTV serían importantes para entender cuándo y dónde son importantes cada una de estas actividades del dominio SECRET.

Los fármacos como Etanercept son medicamentos de cada vez mayor aplicación en la clínica para el tratamiento de algunos desórdenes inflamatorios mediados por el TNFα como la artritis reumatoide. Etanercept es una molécula que consiste en un dímero del dominio extracelular del TNFR2 fusionada a un fragmento Fc humano. En consonancia a lo observado en la patogénesis de ECTV, la adición de un dominio SECRET a Etanercept podría potenciar el efecto anti-inflamatorio de esta molécula, gracias al efecto anti-CK. Por otro lado, una de las funciones del fragmento Fc es la de garantizar la estabilidad y el transporte del fármaco, gracias a su interacción con los receptores celulares de Fc, en el organismo. Un dominio SECRET podría remplazar con éxito estas dos funciones de la porción Fc, aportando estabilidad y transporte de la molécula gracias a su interacción con los GAGs. Además, de esta forma, se evitarían algunos efectos secundarios debidos a la activación del sistema del complemento producida por el Fc de Etanercept (Horiuchi y cols., 2010). Por último, los trabajos de mutagénesis sobre CrmD podrían ayudar a generar inhibidores más eficaces y con una mayor especificidad por el TNFα, frente al bloqueo del TNFα soluble y transmembrana y la LTα, que presumiblemente provoca la administración de Etanercept.

6 CONCLUSIONES

1. CrmD interacciona con alta afinidad con los mTNFSFLs mTNF α , mLT α , mLT β , mAPRIL y mLIGHT y las mCKs mCXCL11, mCXCL12 β , mCXCL13, mCXCL14, mCCL24, mCCL25 y mCCL27. De éstos, CrmD inhibe la actividad *in vitro* de mTNF α , mLT α , mLT β , mCXCL13, mCCL25 y mCCL27.
2. Los dos dominios de CrmD, anti-TNF α y SECRET, son funcional y estructuralmente independientes. Además, el dominio de unión a TNFSFLs de CrmD está definido por las tres primeras repeticiones CRDs (hasta el residuo 151) seguido del dominio SECRET que comienza en un residuo F163 altamente conservado en otras proteínas que presentan este dominio anti-CK.
3. Las bases moleculares de la interacción CrmD-ligando son similares a las llevadas a cabo por el hTNFR2. Sin embargo, existen pequeñas variaciones que han convertido a CrmD en un inhibidor adaptado a los ligandos murinos.
4. La sustitución N77F en la secuencia de CrmD resulta en una proteína (Mut4) incapaz de unir TNF α ni LT α . Sin embargo, la proteína Mut4 inhibió la actividad de las CKs *in vitro* de manera comparable a la proteína parental.
5. Se obtuvieron mutaciones que afectaron a la especificidad de CrmD. Así, por ejemplo algunas mutaciones, como N77A (Mut3), afectaron a la unión de mLT α pero no de mTNF α . Igualmente, el cambio E116A/F117A/E118A (Mut13) mejoró la actividad anti-hLT α de CrmD.
6. Los distintos γ TNFRs de poxvirus, CrmB, CrmC, CrmD y CrmE presentan diferencias de especificidad y afinidad por TNFSFLs, siendo CrmC y CrmE, inhibidores específicos de mTNF α y hTNF α , repectivamente y CrmB y CrmD proteínas con capacidad de bloquear TNF α y LT α .
7. CrmD regula la actividad tanto de ligando como de receptor del tmTNF α *in vitro*. Además, la interacción CrmD-tmTNF α presenta las mismas bases moleculares que la unión de CrmD al sTNF α .
8. CrmD interacciona con los GAGs de las superficies celulares a través de residuos del dominio SECRET localizados en la cara opuesta a la superficie de unión a CKs de este dominio. Además, CrmD puede unir e inhibir el TNF α mientras permanece anclado a los GAGs.
9. CrmD es un factor de virulencia esencial en la patogénesis de ECTV en animales susceptibles BALB/c. Además, la eliminación de cualquiera de los dos dominios de esta proteína, anti-TNF α o SECRET, resultó en un virus altamente atenuado con una $DI_{50} > 10^6$ ufp, 5 órdenes de magnitud mayor a la del virus parental.
10. En ausencia del dominio SECRET, ECTV es capaz de controlar la respuesta de células NK en el ganglio poplíteo de la pata infectada en ratones susceptibles, sin embargo, es necesaria la expresión de la proteína CrmD completa para que la enfermedad progrese.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Aderka, D., H. Englemann, V. Hornik, Y. Skornick, Y. Levo, D. Wallach y G. Kushtai. 1991. Increased serum levels of soluble receptors for tumor necrosis factor in cancer patients. *Cancer Res* 51:5602-5607.
- Aderka, D., A. Wysenbeek, H. Englemann, A.P. Cope, F. Brennan, Y. Molad, V. Hornik, Y. Levo, R.N. Maini, M. Feldmann y cols. 1993. Correlation between serum levels of soluble tumor necrosis factor receptor y disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 36:1111-1120.
- Afonso, C.L., G. Delhon, E.R. Tulman, Z. Lu, A. Zsak, V.M. Becerra, L. Zsak, G.F. Kutish y D.L. Rock. 2005. Genome of deerpox virus. *J Virol* 79:966-977.
- Aggarwal, B.B. 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3:745-756.
- Alcami, A. 2003. Viral mimicry of cytokines, chemokines y their receptors. *Nat Rev Immunol* 3:36-50.
- Alcami, A. y U.H. Koszinowski. 2000. Viral mechanisms of immune evasion. *Mol Med Today* 6:365-372.
- Alcami, A. y M. Saraiva. 2009. Chemokine binding proteins encoded by pathogens. *Adv Exp Med Biol* 666:167-179.
- Alcami, A. y G.L. Smith. 1992. A soluble receptor for interleukin-1 beta encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell* 71:153-167.
- Alcami, A. y G.L. Smith. 1995. Vaccinia, cowpox y camelpox viruses encode soluble gamma interferon receptors with novel broad species specificity. *J Virol* 69:4633-4639.
- Alcami, A. y G.L. Smith. 1996. Receptors for gamma-interferon encoded by poxviruses: implications for the unknown origin of vaccinia virus. *Trends Microbiol* 4:321-326.
- Alcami, A., J.A. Symons, P.D. Collins, T.J. Williams y G.L. Smith. 1998. Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from vaccinia virus. *J Immunol* 160:624-633.
- Alcami, A., J.A. Symons y G.L. Smith. 2000. The vaccinia virus soluble alpha/beta interferon (IFN) receptor binds to the cell surface y protects cells from the antiviral effects of IFN. *J Virol* 74:11230-11239.
- Alejo, A., M.B. Ruiz-Arguello, Y. Ho, V.P. Smith, M. Saraiva y A. Alcami. 2006. A chemokine-binding domain in the tumor necrosis factor receptor from variola (smallpox) virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5995-6000.
- Alejo, A., M. Saraiva, M.B. Ruiz-Arguello, A. Viejo-Borbolla, M.F. de Marco, F.J. Salguero y A. Alcami. 2009. A method for the generation of ectromelia virus (ECTV) recombinants: in vivo analysis of ECTV vCD30 deletion mutants. *PLoS One* 4:e5175.
- Alexander, J.M., C.A. Nelson, V. van Berkel, E.K. Lau, J.M. Studts, T.J. Brett, S.H. Speck, T.M. Handel, H.W. Virgin y D.H. Fremont. 2002. Structural basis of chemokine sequestration by a herpesvirus decoy receptor. *Cell* 111:343-356.
- Alexander-Brett, J.M. y D.H. Fremont. 2007. Dual GPCR y GAG mimicry by the M3 chemokine decoy receptor. *J Exp Med* 204:3157-3172.
- Allie, N., R. Keeton, N. Court, B. Abel, L. Fick, V. Vasseur, R. Vacher, M.L. Olleros, M.S. Drutskaya, R. Guler, S.A. Nedospasov, I. Garcia, B. Ryffel, V.F. Quesniaux y M. Jacobs. 2010. Limited role for lymphotoxin alpha in the host immune response to Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* 185:4292-4301.
- Alzhanova, D., D.M. Edwards, E. Hammarlund, I.G. Scholz, D. Horst, M.J. Wagner, C. Upton, E.J. Wiertz, M.K. Slifka y K. Fruh. 2009. Cowpox virus inhibits the transporter associated with antigen processing to evade T cell recognition. *Cell Host Microbe* 6:433-445.
- Alzhanova, D. y K. Fruh. 2010. Modulation of the host immune response by cowpox virus. *Microbes Infect* 12:900-909.
- Andrewes, C.H. y W.J. Elford. 1947. Infections ectromelia; experiments on interference y immunization. *Br J Exp Pathol* 28:278-285.
- Aoyagi, M., D. Zhai, C. Jin, A.E. Aleshin, B. Stec, J.C. Reed y R.C. Liddington. 2007. Vaccinia virus N1L protein resembles a B cell lymphoma-2 (Bcl-2) family protein. *Protein Sci* 16:118-124.
- Arnold, P.L. y D.H. Fremont. 2006. Structural determinants of chemokine binding by an Ectromelia virus-encoded decoy receptor. *J Virol* 80:7439-7449.
- Baggiolini, M. 1998. Chemokines y leukocyte traffic. *Nature* 392:565-568.
- Bahar, M.W., J.C. Kenyon, M.M. Putz, N.G. Abrescia, J.E. Pease, E.L. Wise, D.I. Stuart, G.L. Smith y J.M. Grimes. 2008. Structure y function of A41, a vaccinia virus chemokine binding protein. *PLoS Pathog* 4:e5.
- Banks, T.A., S. Rickert, C.A. Benedict, L. Ma, M. Ko, J. Meier, W. Ha, K. Schneider, S.W. Granger, O. Turovskaya, D. Elewaut, D. Otero, A.R. French, S.C. Henry, J.D. Hamilton, S. Scheu, K. Pfeffer y C.F. Ware. 2005. A lymphotoxin-IFN-beta axis essential for lymphocyte survival revealed during cytomegalovirus infection. *J Immunol* 174:7217-7225.
- Banner, D.W., A. D'Arcy, W. Janes, R. Gentz, H.J. Schoenfeld, C. Broger, H. Loetscher y W. Lesslauer. 1993. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73:431-445.

- Baroudy, B.M., S. Venkatesan y B. Moss. 1982. Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain. *Cell* 28:315-324.
- Bartlett, N., J.A. Symons, D.C. Tschärke y G.L. Smith. 2002. The vaccinia virus N1L protein is an intracellular homodimer that promotes virulence. *J Gen Virol* 83:1965-1976.
- Bennink, J.R.Y., Y.; Feldman, A.; Gerhard, W.; Doherty, P. 1985. The role of virus-specific CTL in vivo. In *T Cell Clones*. H.V.B. W.Haas., editor Elsevier, Amsterdam. 237-242.
- Biron, C.A., K.S. Byron y J.L. Sullivan. 1989. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* 320:1731-1735.
- Black, R.A., C.T. Rauch, C.J. Kozlosky, J.J. Peschon, J.L. Slack, M.F. Wolfson, B.J. Castner, K.L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K.A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J.N. Fitzner, R.S. Johnson, R.J. Paxton, C.J. March y D.P. Cerretti. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* 385:729-733.
- Bodmer, J.L., P. Schneider y J. Tschopp. 2002. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* 27:19-26.
- Born, T.L., L.A. Morrison, D.J. Esteban, T. VandenBos, L.G. Thebeau, N. Chen, M.K. Spriggs, J.E. Sims y R.M. Buller. 2000. A poxvirus protein that binds to y inactivates IL-18 y inhibits NK cell response. *J Immunol* 164:3246-3254.
- Bowie, A.G. y L. Unterholzner. 2008. Viral evasion y subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 8:911-922.
- Brooks, C.R., T. Elliott, P. Parham y S.I. Khakoo. 2006. The inhibitory receptor NKG2A determines lysis of vaccinia virus-infected autologous targets by NK cells. *J Immunol* 176:1141-1147.
- Browning, J.L., A. Ngam-ek, P. Lawton, J. DeMarinis, R. Tizard, E.P. Chow, C. Hession, B. O'Brine-Greco, S.F. Foley y C.F. Ware. 1993. Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell* 72:847-856.
- Brownstein, D.G. y L. Gras. 1997. Differential pathogenesis of lethal mousepox in congenic DBA/2 mice implicates natural killer cell receptor NKR-P1 in necrotizing hepatitis y the fifth component of complement in recruitment of circulating leukocytes to spleen. *Am J Pathol* 150:1407-1420.
- Broyles, S.S. 2003. Vaccinia virus transcription. *J Gen Virol* 84:2293-2303.
- Brundler, M.A., P. Aichele, M. Bachmann, D. Kitamura, K. Rajewsky y R.M. Zinkernagel. 1996. Immunity to viruses in B cell-deficient mice: influence of antibodies on virus persistence y on T cell memory. *Eur J Immunol* 26:2257-2262.
- Brunetti, C.R., M. Paulose-Murphy, R. Singh, J. Qin, J.W. Barrett, A. Tardivel, P. Schneider, K. Essani y G. McFadden. 2003. A secreted high-affinity inhibitor of human TNF from Tanapox virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4831-4836.
- Bruns, P. 1888. Die Heilwirkung des Erysipelas auf Geschwülste. *Beitr Klin Chir*.
- Bryant, N.A., N. Davis-Poynter, A. Vanderplasschen y A. Alami. 2003. Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *Embo J* 22:833-846.
- Bukowski, J.F., B.A. Woda y R.M. Welsh. 1984. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J Virol* 52:119-128.
- Buller, R.M. 1985. The BALB/c mouse as a model to study orthopoxviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 122:148-153.
- Buller, R.M., S. Chakrabarti, B. Moss y T. Fredrickson. 1988. Cell proliferative response to vaccinia virus is mediated by VGF. *Virology* 164:182-192.
- Burns, J.M., D.J. Dairaghi, M. Deitz, M. Tsang y T.J. Schall. 2002. Comprehensive mapping of poxvirus vCCI chemokine-binding protein. Expanded range of ligand interactions y unusual dissociation kinetics. *J Biol Chem* 277:2785-2789.
- Byun, M., X. Wang, M. Pak, T.H. Hansen y W.M. Yokoyama. 2007. Cowpox virus exploits the endoplasmic reticulum retention pathway to inhibit MHC class I transport to the cell surface. *Cell Host Microbe* 2:306-315.
- Campbell, J.A., D.S. Trossman, W.M. Yokoyama y L.N. Carayannopoulos. 2007. Zoonotic orthopoxviruses encode a high-affinity antagonist of NKG2D. *J Exp Med* 204:1311-1317.
- Carfi, A., C.A. Smith, P.J. Smolak, J. McGrew y D.C. Wiley. 1999. Structure of a soluble secreted chemokine inhibitor vCCI (p35) from cowpox virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12379-12383.
- Carswell, E.A., L.J. Old, R.L. Kassel, S. Green, N. Fiore y B. Williamson. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:3666-3670.
- Carter, G.C., G. Rodger, B.J. Murphy, M. Law, O. Krauss, M. Hollinshead y G.L. Smith. 2003. Vaccinia virus cores are transported on microtubules. *J Gen Virol* 84:2443-2458.
- Chan, F.K., H.J. Chun, L. Zheng, R.M. Siegel, K.L. Bui y M.J. Lenardo. 2000. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly y signaling. *Science* 288:2351-2354.

- Chang, S.J., J.C. Hsiao, S. Sonnberg, C.T. Chiang, M.H. Yang, D.L. Tzou, A.A. Mercer y W. Chang. 2009. Poxvirus host range protein CP77 contains an F-box-like domain that is necessary to suppress NF-kappaB activation by tumor necrosis factor alpha but is independent of its host range function. *J Virol* 83:4140-4152.
- Chantrey, J., H. Meyer, D. Baxby, M. Begon, K.J. Bown, S.M. Hazel, T. Jones, W.I. Montgomery y M. Bennett. 1999. Cowpox: reservoir hosts y geographic range. *Epidemiol Infect* 122:455-460.
- Chapman, J.L., D.K. Nichols, M.J. Martinez y J.W. Raymond. 2010. Animal models of orthopoxvirus infection. *Vet Pathol* 47:852-870.
- Chaudhri, G., V. Panchanathan, R.M. Buller, A.J. van den Eertwegh, E. Claassen, J. Zhou, R. de Chazal, J.D. Laman y G. Karupiah. 2004. Polarized type 1 cytokine response y cell-mediated immunity determine genetic resistance to mousepox. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9057-9062.
- Chisholm, S.E. y H.T. Reyburn. 2006. Recognition of vaccinia virus-infected cells by human natural killer cells depends on natural cytotoxicity receptors. *J Virol* 80:2225-2233.
- Cliquet, F., J. Barrat, A.L. Guiot, N. Cael, S. Boutrand, J. Maki y C.L. Schumacher. 2008. Efficacy y bait acceptance of vaccinia vectored rabies glycoprotein vaccine in captive foxes (*Vulpes vulpes*), raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) y dogs (*Canis familiaris*). *Vaccine* 26:4627-4638.
- Colamonici, O.R., P. Domanski, S.M. Sweitzer, A. Larner y R.M. Buller. 1995. Vaccinia virus B18R gene encodes a type I interferon-binding protein that blocks interferon alpha transmembrane signaling. *J Biol Chem* 270:15974-15978.
- Combadiere, C., S. Potteaux, M. Rodero, T. Simon, A. Pezard, B. Esposito, R. Merval, A. Proudfoot, A. Tedgui y Z. Mallat. 2008. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1 y CCR5 abrogates Ly6C(hi) y Ly6C(lo) monocytosis y almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 117:1649-1657.
- Compaan, D.M. y S.G. Hymowitz. 2006. The crystal structure of the costimulatory OX40-OX40L complex. *Structure* 14:1321-1330.
- Cunnion, K.M. 1999. Tumor necrosis factor receptors encoded by poxviruses. *Mol Genet Metab* 67:278-282.
- Cyrklaff, M., C. Risco, J.J. Fernandez, M.V. Jimenez, M. Esteban, W. Baumeister y J.L. Carrascosa. 2005. Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2772-2777.
- Dabbagh, K., Y. Xiao, C. Smith, P. Stepick-Biek, S.G. Kim, W.J. Lamm, D.H. Liggitt y D.B. Lewis. 2000. Local blockade of allergic airway hyperreactivity y inflammation by the poxvirus-derived pan-CC-chemokine inhibitor vCCI. *J Immunol* 165:3418-3422.
- Day, E.S., T.G. Cachero, F. Qian, Y. Sun, D. Wen, M. Pelletier, Y.M. Hsu y A. Whitty. 2005. Selectivity of BAFF/BLyS y APRIL for binding to the TNF family receptors BAFFR/BR3 y BCMA. *Biochemistry* 44:1919-1931.
- De Togni, P., J. Goellner, N.H. Ruddie, P.R. Streeter, A. Fick, S. Mariathasan, S.C. Smith, R. Carlson, L.P. Shornick, J. Strauss-Schoenberger y cols. 1994. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* 264:703-707.
- Delano, M.L. y D.G. Brownstein. 1995. Innate resistance to lethal mousepox is genetically linked to the NK gene complex on chromosome 6 y correlates with early restriction of virus replication by cells with an NK phenotype. *J Virol* 69:5875-5877.
- Deng, G.M., L. Zheng, F.K. Chan y M. Lenardo. 2005. Amelioration of inflammatory arthritis by targeting the pre-ligand assembly domain of tumor necrosis factor receptors. *Nat Med* 11:1066-1072.
- Deruaz, M., A. Frauensschuh, A.L. Alessandri, J.M. Dias, F.M. Coelho, R.C. Russo, B.R. Ferreira, G.J. Graham, J.P. Shaw, T.N. Wells, M.M. Teixeira, C.A. Power y A.E. Proudfoot. 2008. Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *J Exp Med* 205:2019-2031.
- Dias, J.M., C. Losberger, M. Deruaz, C.A. Power, A.E. Proudfoot y J.P. Shaw. 2009. Structural basis of chemokine sequestration by a tick chemokine binding protein: the crystal structure of the complex between Evasin-1 y CCL3. *PLoS One* 4:e8514.
- Dick, E.J., Jr., C.L. Kittell, H. Meyer, P.L. Farrar, S.L. Ropp, J.J. Esposito, R.M. Buller, H. Neubauer, Y.H. Kang y A.E. McKee. 1996. Mousepox outbreak in a laboratory mouse colony. *Lab Anim Sci* 46:602-611.
- Dillon, S.R., J.A. Gross, S.M. Ansell y A.J. Novak. 2006. An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 5:235-246.
- Dobbelstein, M. y T. Shenk. 1996. Protection against apoptosis by the vaccinia virus SPI-2 (B13R) gene product. *J Virol* 70:6479-6485.
- Doceul, V., M. Hollinshead, L. van der Linden y G.L. Smith. 2010. Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread. *Science* 327:873-876.
- Dokun, A.O., S. Kim, H.R. Smith, H.S. Kang, D.T. Chu y W.M. Yokoyama. 2001. Specific y nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nat Immunol* 2:951-956.
- Domonkos, A., A. Udvardy, L. Laszlo, T. Nagy y E. Duda. 2001. Receptor-like properties of the 26 kDa transmembrane form of TNF. *Eur Cytokine Netw* 12:411-419.

- Duerst, R.J. y L.A. Morrison. 2003. Innate immunity to herpes simplex virus type 2. *Viral Immunol* 16:475-490.
- Eissner, G., W. Kolch y P. Scheurich. 2004. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:353-366.
- Essbauer, S., M. Pfeffer y H. Meyer. 2010. Zoonotic poxviruses. *Vet Microbiol* 140:229-236.
- Esteban, D.J. y R.M. Buller. 2005. Ectromelia virus: the causative agent of mousepox. *J Gen Virol* 86:2645-2659.
- Esteban, M. 2009. Attenuated poxvirus vectors MVA y NYVAC as promising vaccine candidates against HIV/AIDS. *Hum Vaccin* 5:867-871.
- Etzioni, A., C. Eidenschenk, R. Katz, R. Beck, J.L. Casanova y S. Pollack. 2005. Fatal varicella associated with selective natural killer cell deficiency. *J Pediatr* 146:423-425.
- Fang, M., L.L. Lanier y L.J. Sigal. 2008. A role for NKG2D in NK cell-mediated resistance to poxvirus disease. *PLoS Pathog* 4:e30.
- Fang, M., M.T. Orr, P. Spee, T. Egebjerg, L.L. Lanier y L.J. Sigal. 2011. CD94 is essential for NK cell-mediated resistance to a lethal viral disease. *Immunity* 34:579-589.
- Fang, M. y L.J. Sigal. 2005. Antibodies y CD8+ T cells are complementary y essential for natural resistance to a highly lethal cytopathic virus. *J Immunol* 175:6829-6836.
- Fenner, F. 1948. The pathogenesis of the acute exanthems; an interpretation based on experimental investigations with mousepox; infectious ectromelia of mice. *Lancet* 2:915-920.
- Fenner, F. 1980. The global eradication of smallpox. *Med J Aust* 1:455-455.
- Fenner, F. 1981. Mousepox (infectious ectromelia): past, present y future. *Lab Anim Sci* 31:553-559.
- Fenner, F. 1993. Smallpox: emergence, global spread y eradication. *Hist Philos Life Sci* 15:397-420.
- Ferlazzo, G., D. Thomas, S.L. Lin, K. Goodman, B. Morandi, W.A. Muller, A. Moretta y C. Munz. 2004. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors y become cytolytic. *J Immunol* 172:1455-1462.
- Fernandez de Marco, M., A. Alejo, P. Hudson, I.K. Damon y A. Alcami. 2010. The highly virulent variola y monkeypox viruses express secreted inhibitors of type I interferon. *Faseb J* 24:1479-1488.
- Fischer, M.A., M.L. Davies, I.E. Reider, E.L. Heipertz, M.R. Epler, J.J. Sei, M.A. Ingersoll, N.V. Rooijen, G.J. Randolph y C.C. Norbury. 2011. CD11b, Ly6G cells produce type I interferon y exhibit tissue protective properties following peripheral virus infection. *PLoS Pathog* 7:e1002374.
- Flynn, J.L., M.M. Goldstein, J. Chan, K.J. Triebold, K. Pfeffer, C.J. Lowenstein, R. Schreiber, T.W. Mak y B.R. Bloom. 1995. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 2:561-572.
- Frauenschu, A., C.A. Power, M. Deruaz, B.R. Ferreira, J.S. Silva, M.M. Teixeira, J.M. Dias, T. Martin, T.N. Wells y A.E. Proudfoot. 2007. Molecular cloning y characterization of a highly selective chemokine-binding protein from the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *J Biol Chem* 282:27250-27258.
- French, A.R. y W.M. Yokoyama. 2003. Natural killer cells y viral infections. *Curr Opin Immunol* 15:45-51.
- Frischknecht, F., V. Moreau, S. Rottger, S. Gonfloni, I. Reckmann, G. Superti-Furga y M. Way. 1999. Actin-based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine kinase signalling. *Nature* 401:926-929.
- Furuya, T., M. Koga, K. Hikami, A. Kawasaki y N. Tsuchiya. 2011. Effects of APRIL (TNFSF13) polymorphisms y splicing isoforms on the secretion of soluble APRIL. *Mod Rheumatol*
- Garin, A. y A.E. Proudfoot. 2011. Chemokines as targets for therapy. *Exp Cell Res* 317:602-612.
- Gileva, I.P., T.S. Nepomnyashchikh, D.V. Antonets, L.R. Lebedev, G.V. Kochneva, A.V. Grazhdantseva y S.N. Shchelkunov. 2006. Properties of the recombinant TNF-binding proteins from variola, monkeypox y cowpox viruses are different. *Biochim Biophys Acta* 1764:1710-1718.
- Gomez, C.E., J.L. Najera, M. Krupa y M. Esteban. 2008. The poxvirus vectors MVA y NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases y cancer. *Curr Gene Ther* 8:97-120.
- Graham, K.A., A.S. Lalani, J.L. Macen, T.L. Ness, M. Barry, L.Y. Liu, A. Lucas, I. Clark-Lewis, R.W. Moyer y G. McFadden. 1997. The T1/35kDa family of poxvirus-secreted proteins bind chemokines y modulate leukocyte influx into virus-infected tissues. *Virology* 229:12-24.
- Graham, S.C., M.W. Bahar, N.G. Abrescia, G.L. Smith, D.I. Stuart y J.M. Grimes. 2007. Structure of CrmE, a virus-encoded tumour necrosis factor receptor. *J Mol Biol* 372:660-671.
- Gratz, M.S., Y. Suezter, M. Kremer, A. Volz, M. Majzoub, K.M. Hanschmann, U. Kalinke, A. Schwantes y G. Sutter. 2011. N1L is an ectromelia virus virulence factor y essential for in vivo spread upon respiratory infection. *J Virol* 85:3557-3569.
- Gravestine, L.A. y J. Borst. 1998. Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system. *Semin Immunol* 10:423-434.
- Grell, M. 1995. Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble y membrane-expressed TNF. *J Inflamm* 47:8-17.

- Grell, M., E. Douni, H. Wajant, M. Lohden, M. Clauss, B. Maxeiner, S. Georgopoulos, W. Lesslauer, G. Kollias, K. Pfizenmaier y P. Scheurich. 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83:793-802.
- Grell, M., H. Wajant, G. Zimmermann y P. Scheurich. 1998. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:570-575.
- Grunewald, K. y M. Cyrklaff. 2006. Structure of complex viruses y virus-infected cells by electron cryo tomography. *Curr Opin Microbiol* 9:437-442.
- Hahne, M., T. Kataoka, M. Schroter, K. Hofmann, M. Irmeler, J.L. Bodmer, P. Schneider, T. Bornand, N. Holler, L.E. French, B. Sordat, D. Rimoldi y J. Tschopp. 1998. APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *J Exp Med* 188:1185-1190.
- Handel, T.M., Z. Johnson, S.E. Crown, E.K. Lau y A.E. Proudfoot. 2005. Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annu Rev Biochem* 74:385-410.
- Harrop, J.A., P.C. McDonnell, M. Brigham-Burke, S.D. Lyn, J. Minton, K.B. Tan, K. Dede, J. Spampinato, C. Silverman, P. Hensley, R. DiPrinzio, J.G. Emery, K. Deen, C. Eichman, M. Chabot-Fletcher, A. Truneh y P.R. Young. 1998. Herpesvirus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells y inhibits HT29 cell growth. *J Biol Chem* 273:27548-27556.
- Hawkrige, T., T.J. Scriba, S. Gelderbloem, E. Smit, M. Tameris, S. Moyo, T. Lang, A. Veldsman, M. Hatherill, L. Merwe, H.A. Fletcher, H. Mahomed, A.V. Hill, W.A. Hanekom, G.D. Hussey y H. McShane. 2008. Safety y immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in healthy adults in South Africa. *J Infect Dis* 198:544-552.
- Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776.
- Hensley, S.E., S.R. Das, A.L. Bailey, L.M. Schmidt, H.D. Hickman, A. Jayaraman, K. Viswanathan, R. Raman, R. Sasisekharan, J.R. Bennink y J.W. Yewdell. 2009. Hemagglutinin receptor binding avidity drives influenza A virus antigenic drift. *Science* 326:734-736.
- Hileman, R.E., J.R. Fromm, J.M. Weiler y R.J. Linhardt. 1998. Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins. *Bioessays* 20:156-167.
- Homey, B., H. Alenius, A. Muller, H. Soto, E.P. Bowman, W. Yuan, L. McEvoy, A.I. Lauerma, T. Assmann, E. Bunemann, M. Lehto, H. Wolff, D. Yen, H. Marxhausen, W. To, J. Sedgwick, T. Ruzicka, P. Lehmann y A. Zlotnik. 2002. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med* 8:157-165.
- Horiuchi, T., H. Mitoma, S. Harashima, H. Tsukamoto y T. Shimoda. 2010. Transmembrane TNF-alpha: structure, function y interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)* 49:1215-1228.
- Hornung, E. 1997. The Pharaoh.
- Hu, F.Q., C.A. Smith y D.J. Pickup. 1994. Cowpox virus contains two copies of an early gene encoding a soluble secreted form of the type II TNF receptor. *Virology* 204:343-356.
- Huang, J., S.V. Smirnov, A. Lewis-Antes, M. Balan, W. Li, S. Tang, G.V. Silke, M.M. Putz, G.L. Smith y S.V. Kotenko. 2007. Inhibition of type I y type III interferons by a secreted glycoprotein from Yaba-like disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:9822-9827.
- Hymowitz, S.G., H.W. Christinger, G. Fuh, M. Ultsch, M. O'Connell, R.F. Kelley, A. Ashkenazi y A.M. de Vos. 1999. Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol Cell* 4:563-571.
- Imlach, W., C.A. McCaughan, A.A. Mercer, D. Haig y S.B. Fleming. 2002. Orf virus-encoded interleukin-10 stimulates the proliferation of murine mast cells y inhibits cytokine synthesis in murine peritoneal macrophages. *J Gen Virol* 83:1049-1058.
- Isaacs, A. y J. Lindenmann. 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147:258-267.
- Iyer, L.M., L. Aravind y E.V. Koonin. 2001. Common origin of four diverse families of large eukaryotic DNA viruses. *J Virol* 75:11720-11734.
- Iyer, L.M., S. Balaji, E.V. Koonin y L. Aravind. 2006. Evolutionary genomics of nucleo-cytoplasmic large DNA viruses. *Virus Res* 117:156-184.
- Jezek, Z., S.S. Marennikova, M. Mutumbo, J.H. Nakano, K.M. Paluku y M. Szczeniowski. 1986. Human monkeypox: a study of 2,510 contacts of 214 patients. *J Infect Dis* 154:551-555.
- Karupiah, G., R.M. Buller, N. Van Rooijen, C.J. Duarte y J. Chen. 1996. Different roles for CD4+ y CD8+ T lymphocytes y macrophage subsets in the control of a generalized virus infection. *J Virol* 70:8301-8309.
- Karupiah, G., T.N. Fredrickson, K.L. Holmes, L.H. Khairallah y R.M. Buller. 1993. Importance of interferons in recovery from mousepox. *J Virol* 67:4214-4226.
- Katcher, H.L., M. Samuel y G.B. Villanueva. 1992. A simple y rapid method to study the association of the contact proteins of blood coagulation. *Thromb Res* 68:443-450.
- Kettle, S., A. Alcamí, A. Khanna, R. Ehret, C. Jassoy y G.L. Smith. 1997. Vaccinia virus serpin B13R (SPI-2) inhibits interleukin-1beta-converting enzyme y protects virus-infected cells from TNF- y Fas-mediated apoptosis, but does not prevent IL-1beta-induced fever. *J Gen Virol* 78 (Pt 3):677-685.

- Kim, E.M., W.S. Uhm, S.C. Bae, D.H. Yoo y T.H. Kim. 2011. Incidence of tuberculosis among Korean patients with ankylosing spondylitis who are taking tumor necrosis factor blockers. *J Rheumatol* 38:2218-2223.
- Kledal, T.N., M.M. Rosenkilde, F. Coulin, G. Simmons, A.H. Johnsen, S. Alouani, C.A. Power, H.R. Luttichau, J. Gerstoft, P.R. Clapham, I. Clark-Lewis, T.N. Wells y T.W. Schwartz. 1997. A broad-spectrum chemokine antagonist encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Science* 277:1656-1659.
- Koni, P.A., R. Sacca, P. Lawton, J.L. Browning, N.H. Ruddle y R.A. Flavell. 1997. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha y beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. *Immunity* 6:491-500.
- Koonin, E.V., T.G. Senkevich y V.V. Dolja. 2006. The ancient Virus World y evolution of cells. *Biol Direct* 1:29.
- Lalani, A.S., K. Graham, K. Mossman, K. Rajarathnam, I. Clark-Lewis, D. Kelvin y G. McFadden. 1997. The purified myxoma virus gamma interferon receptor homolog M-T7 interacts with the heparin-binding domains of chemokines. *J Virol* 71:4356-4363.
- Law, M., G.C. Carter, K.L. Roberts, M. Hollinshead y G.L. Smith. 2006. Ligand-induced y nonfusogenic dissolution of a viral membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5989-5994.
- Lee, H.J., K. Essani y G.L. Smith. 2001. The genome sequence of Yaba-like disease virus, a yatapoxvirus. *Virology* 281:170-192.
- Leeuwenberg, J.F., L.J. van Tits, T.M. Jeunhomme y W.A. Buurman. 1995. Evidence for exclusive role in signalling of tumour necrosis factor p55 receptor y a potentiating function of p75 receptor on human endothelial cells. *Cytokine* 7:457-462.
- Lefkowitz, E.J., C. Wang y C. Upton. 2006. Poxviruses: past, present y future. *Virus Res* 117:105-118.
- Lengyel, P. 1982. Biochemistry of interferons y their actions. *Annu Rev Biochem* 51:251-282.
- Lewis, J.A. 1982. The mechanism of action of interferon. *Horiz Biochem Biophys* 6:357-384.
- Lin, X., X. Ma, M. Rodriguez, X. Feng, L. Zoecklein, Y.X. Fu y R.P. Roos. 2003. Membrane lymphotoxin is required for resistance to Theiler's virus infection. *Int Immunol* 15:955-962.
- Locksley, R.M., N. Killeen y M.J. Lenardo. 2001. The TNF y TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104:487-501.
- Loetscher, H., M. Brockhaus, Z. Dembic, R. Gentz, U. Gubler, H.P. Hohmann, H.W. Lahm, A.P. Van Loon, Y.C. Pan, E.J. Schlaeger y cols. 1991. Two distinct tumour necrosis factor receptors--members of a new cytokine receptor gene family. *Oxf Surv Eukaryot Genes* 7:119-142.
- Loetscher, H., D. Stueber, D. Banner, F. Mackay y W. Lesslauer. 1993. Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors. *J Biol Chem* 268:26350-26357.
- Loparev, V.N., J.M. Parsons, J.C. Knight, J.F. Panus, C.A. Ray, R.M. Buller, D.J. Pickup y J.J. Esposito. 1998. A third distinct tumor necrosis factor receptor of orthopoxviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3786-3791.
- Luttichau, H.R., J. Stine, T.P. Boesen, A.H. Johnsen, D. Chantry, J. Gerstoft y T.W. Schwartz. 2000. A highly selective CC chemokine receptor (CCR)8 antagonist encoded by the poxvirus molluscum contagiosum. *J Exp Med* 191:171-180.
- Mahy, B.W., J.W. Almond, K.I. Berns, R.M. Chanock, D.K. Lvov, R.F. Pettersson, H.G. Schatzmayr y F. Fenner. 1993. The remaining stocks of smallpox virus should be destroyed. *Science* 262:1223-1224.
- Marchal, J. 1930. Infectious ectromelia. A hitherto undescribed virus disease of mice. *The Journal of pathology y bacteriology* 713-728.
- Martin, A.P., J.M. Alexander-Brett, C. Canasto-Chibuque, A. Garin, J.S. Bromberg, D.H. Fremont y S.A. Lira. 2007. The chemokine binding protein M3 prevents diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin. *J Immunol* 178:4623-4631.
- Martin-Fontecha, A., L.L. Thomsen, S. Brett, C. Gerard, M. Lipp, A. Lanzavecchia y F. Sallusto. 2004. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 5:1260-1265.
- Matsumoto, M., S. Mariathasan, M.H. Nahm, F. Baranyay, J.J. Peschon y D.D. Chaplin. 1996. Role of lymphotoxin y the type I TNF receptor in the formation of germinal centers. *Science* 271:1289-1291.
- Mayr, A., H. Stickl, H.K. Muller, K. Danner y H. Singer. 1978. [The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination y behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol B* 167:375-390.
- Medvedev, A.E., T. Espevik, G. Ranges y A. Sundan. 1996. Distinct roles of the two tumor necrosis factor (TNF) receptors in modulating TNF y lymphotoxin alpha effects. *J Biol Chem* 271:9778-9784.
- Melo-Silva, C.R., D.C. Tschärke, M. Lobigs, A. Koskinen, Y.C. Wong, R.M. Buller, A. Mullbacher y M. Regner. 2011. The ectromelia virus SPI-2 protein causes lethal mousepox by preventing NK cell responses. *J Virol* 85:11170-11182.

- Merchinsky, M. 1990. Resolution of poxvirus telomeres: processing of vaccinia virus concatemer junctions by conservative strand exchange. *J Virol* 64:3437-3446.
- Mohamed, M.R. y G. McFadden. 2009. NFkB inhibitors: strategies from poxviruses. *Cell Cycle* 8:3125-3132.
- Montanuy, I., A. Alejo y A. Alcami. 2011. Glycosaminoglycans mediate retention of the poxvirus type I interferon binding protein at the cell surface to locally block interferon antiviral responses. *Faseb J* 25:1960-1971.
- Mosmann, T.R. y R.L. Coffman. 1989. TH1 y TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7:145-173.
- Mosmann, T.R. y S. Sad. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 y more. *Immunol Today* 17:138-146.
- Mossman, K., P. Nation, J. Macen, M. Garbutt, A. Lucas y G. McFadden. 1996. Myxoma virus M-T7, a secreted homolog of the interferon-gamma receptor, is a critical virulence factor for the development of myxomatosis in European rabbits. *Virology* 215:17-30.
- Mossman, K., C. Upton y G. McFadden. 1995. The myxoma virus-soluble interferon-gamma receptor homolog, M-T7, inhibits interferon-gamma in a species-specific manner. *J Biol Chem* 270:3031-3038.
- Mukai, Y., T. Nakamura, M. Yoshikawa, Y. Yoshioka, S. Tsunoda, S. Nakagawa, Y. Yamagata y Y. Tsutsumi. 2010. Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex. *Sci Signal* 3:ra83.
- Mukai, Y., H. Shibata, T. Nakamura, Y. Yoshioka, Y. Abe, T. Nomura, M. Tanai, T. Ohta, S. Ikemizu, S. Nakagawa, S. Tsunoda, H. Kamada, Y. Yamagata y Y. Tsutsumi. 2009. Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) y its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant. *J Mol Biol* 385:1221-1229.
- Mullbacher, A., R.T. Hla, C. Museteanu y M.M. Simon. 1999a. Perforin is essential for control of ectromelia virus but not related poxviruses in mice. *J Virol* 73:1665-1667.
- Mullbacher, A., P. Waring, R. Tha Hla, T. Tran, S. Chin, T. Stehle, C. Museteanu y M.M. Simon. 1999b. Granzymes are the essential downstream effector molecules for the control of primary virus infections by cytolytic leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13950-13955.
- Mutsaers, Y., N. Zauberman, I. Sabanay y A. Minsky. 2010. Vaccinia-like cytoplasmic replication of the giant Mimivirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:5978-5982.
- Najarro, P., H.J. Lee, J. Fox, J. Pease y G.L. Smith. 2003. Yaba-like disease virus protein 7L is a cell-surface receptor for chemokine CCL1. *J Gen Virol* 84:3325-3336.
- Nakane, A., T. Minagawa y K. Kato. 1988. Endogenous tumor necrosis factor (cachectin) is essential to host resistance against *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun* 56:2563-2569.
- Ng, A., D.C. Tscharke, P.C. Reading y G.L. Smith. 2001. The vaccinia virus A41L protein is a soluble 30 kDa glycoprotein that affects virus virulence. *J Gen Virol* 82:2095-2105.
- Okeke, M.I., H. Hansen y T. Traavik. 2012. A naturally occurring cowpox virus with an ectromelia virus A-type inclusion protein gene displays atypical A-type inclusions. *Infect Genet Evol* 12:160-168.
- OMS. 2010. Scientific review of variola virus research 1999-2010. Organización Mundial de la Salud.
- Ottenhoff, T.H., F.A. Verreck, E.G. Lichtenauer-Kaligis, M.A. Hoeve, O. Sanal y J.T. van Dissel. 2002. Genetics, cytokines y human infectious disease: lessons from weakly pathogenic mycobacteria y salmonellae. *Nat Genet* 32:97-105.
- Panus, J.F., C.A. Smith, C.A. Ray, T.D. Smith, D.D. Patel y D.J. Pickup. 2002. Cowpox virus encodes a fifth member of the tumor necrosis factor receptor family: a soluble, secreted CD30 homologue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8348-8353.
- Parker, A.K., S. Parker, W.M. Yokoyama, J.A. Corbett y R.M. Buller. 2007. Induction of natural killer cell responses by ectromelia virus controls infection. *J Virol* 81:4070-4079.
- Parry, C.M., J.P. Simas, V.P. Smith, C.A. Stewart, A.C. Minson, S. Efsthathiou y A. Alcami. 2000. A broad spectrum secreted chemokine binding protein encoded by a herpesvirus. *J Exp Med* 191:573-578.
- Paulose, M., B.L. Bennett, A.M. Manning y K. Essani. 1998. Selective inhibition of TNF-alpha induced cell adhesion molecule gene expression by tanapox virus. *Microb Pathog* 25:33-41.
- Pearce, E.J. y A.S. MacDonald. 2002. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol* 2:499-511.
- Penfold, M.E., D.J. Dairaghi, G.M. Duke, N. Saederup, E.S. Mocarski, G.W. Kemble y T.J. Schall. 1999. Cytomegalovirus encodes a potent alpha chemokine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9839-9844.
- Perdiguerro, B. y M. Esteban. 2009. The interferon system y vaccinia virus evasion mechanisms. *J Interferon Cytokine Res* 29:581-598.
- Peschon, J.J., J.L. Slack, P. Reddy, K.L. Stocking, S.W. Sunnarborg, D.C. Lee, W.E. Russell, B.J. Castner, R.S. Johnson, J.N. Fitzner, R.W. Boyce, N. Nelson, C.J. Kozlosky, M.F. Wolfson, C.T. Rauch, D.P. Cerretti, R.J. Paxton, C.J. March y R.A. Black. 1998. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282:1281-1284.
- Proudfoot, A.E., T.M. Handel, Z. Johnson, E.K. Lau, P. LiWang, I. Clark-Lewis, F. Borlat, T.N. Wells y M.H. Kosco-Vilbois. 2003. Glycosaminoglycan binding y oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1885-1890.

- Quan, L.T., A. Caputo, R.C. Bleackley, D.J. Pickup y G.S. Salvesen. 1995. Granzyme B is inhibited by the cowpox virus serpin cytokine response modifier A. *J Biol Chem* 270:10377-10379.
- Rahman, M.M., D. Jeng, R. Singh, J. Coughlin, K. Essani y G. McFadden. 2009. Interaction of human TNF y beta2-microglobulin with Tanapox virus-encoded TNF inhibitor, TPV-2L. *Virology* 386:462-468.
- Reading, P.C., A. Khanna y G.L. Smith. 2002. Vaccinia virus CrmE encodes a soluble y cell surface tumor necrosis factor receptor that contributes to virus virulence. *Virology* 292:285-298.
- Reading, P.C., J.A. Symons y G.L. Smith. 2003. A soluble chemokine-binding protein from vaccinia virus reduces virus virulence y the inflammatory response to infection. *J Immunol* 170:1435-1442.
- Reed, C., Z.Q. Fu, J. Wu, Y.N. Xue, R.W. Harrison, M.J. Chen y I.T. Weber. 1997. Crystal structure of TNF-alpha mutant R31D with greater affinity for receptor R1 compared with R2. *Protein Eng* 10:1101-1107.
- Reed, K.D., J.W. Melski, M.B. Graham, R.L. Regnery, M.J. Sotir, M.V. Wegner, J.J. Kazmierczak, E.J. Stratman, Y. Li, J.A. Fairley, G.R. Swain, V.A. Olson, E.K. Sargent, S.C. Kehl, M.A. Frace, R. Kline, S.L. Foldy, J.P. Davis y I.K. Damon. 2004. The detection of monkeypox in humans in the Western Hemisphere. *N Engl J Med* 350:342-350.
- Riedel, S. 2005. Edward Jenner y the history of smallpox y vaccination. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 18:21-25.
- Rimoin, A.W., N. Kisalu, B. Kebela-Ilunga, T. Mukaba, L.L. Wright, P. Formenty, N.D. Wolfe, R.L. Shongo, F. Tshioko, E. Okitolonda, J.J. Muyembe, R.W. Ryder y H. Meyer. 2007. Endemic human monkeypox, Democratic Republic of Congo, 2001-2004. *Emerg Infect Dis* 13:934-937.
- Rimoin, A.W., P.M. Mulembakani, S.C. Johnston, J.O. Lloyd Smith, N.K. Kisalu, T.L. Kinkela, S. Blumberg, H.A. Thomassen, B.L. Pike, J.N. Fair, N.D. Wolfe, R.L. Shongo, B.S. Graham, P. Formenty, E. Okitolonda, L.E. Hensley, H. Meyer, L.L. Wright y J.J. Muyembe. 2010. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16262-16267.
- Risco, C., J.R. Rodriguez, C. Lopez-Iglesias, J.L. Carrascosa, M. Esteban y D. Rodriguez. 2002. Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment membranes y vimentin filaments participate in vaccinia virus assembly. *J Virol* 76:1839-1855.
- Roberts, K.L. y G.L. Smith. 2008. Vaccinia virus morphogenesis y dissemination. *Trends Microbiol* 16:472-479.
- Rossol, M., U. Meusch, M. Pierer, S. Kaltenhauser, H. Hantzschel, S. Hauschildt y U. Wagner. 2007. Interaction between transmembrane TNF y TNFR1/2 mediates the activation of monocytes by contact with T cells. *J Immunol* 179:4239-4248.
- Roux-Lombard, P., L. Punzi, F. Hasler, S. Bas, S. Todesco, H. Gallati, P.A. Guerne y J.M. Dayer. 1993. Soluble tumor necrosis factor receptors in human inflammatory synovial fluids. *Arthritis Rheum* 36:485-489.
- Ruby, J., H. Bluethmann y J.J. Peschon. 1997. Antiviral activity of tumor necrosis factor (TNF) is mediated via p55 y p75 TNF receptors. *J Exp Med* 186:1591-1596.
- Ruiz-Arguello, M.B., A. Alejo, S. Pontejo, M. Fernandez-de Marco, M. Saraiva y A. Alcami. 2012. TNF y chemokine inhibition by the secreted ectromelia virus CrmD protein are essential for mousepox pathogenesis. *In preparation*
- Ruiz-Arguello, M.B., V.P. Smith, G.S. Campanella, F. Baleux, F. Arenzana-Seisdedos, A.D. Luster y A. Alcami. 2008. An ectromelia virus protein that interacts with chemokines through their glycosaminoglycan binding domain. *J Virol* 82:917-926.
- Sakala, I.G., G. Chaudhri, R.M. Buller, A.A. Nuara, H. Bai, N. Chen y G. Karupiah. 2007. Poxvirus-encoded gamma interferon binding protein dampens the host immune response to infection. *J Virol* 81:3346-3353.
- Sambhi, S.K., M.R. Kohonen-Corish y I.A. Ramshaw. 1991. Local production of tumor necrosis factor encoded by recombinant vaccinia virus is effective in controlling viral replication in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4025-4029.
- Saraiva, M. y A. Alcami. 2001. CrmE, a novel soluble tumor necrosis factor receptor encoded by poxviruses. *J Virol* 75:226-233.
- Saraiva, M., P. Smith, P.G. Fallon y A. Alcami. 2002. Inhibition of type 1 cytokine-mediated inflammation by a soluble CD30 homologue encoded by ectromelia (mousepox) virus. *J Exp Med* 196:829-839.
- Saunders, B.M., S. Tran, S. Ruuls, J.D. Sedgwick, H. Briscoe y W.J. Britton. 2005. Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration y granuloma formation y provide acute, but not long-term, control of Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* 174:4852-4859.
- Schluter, D. y M. Deckert. 2000. The divergent role of tumor necrosis factor receptors in infectious diseases. *Microbes Infect* 2:1285-1292.
- Schmelz, M., B. Sodeik, M. Ericsson, E.J. Wolffe, H. Shida, G. Hiller y G. Griffiths. 1994. Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. *J Virol* 68:130-147.
- Schreiber, M. y G. McFadden. 1994. The myxoma virus TNF-receptor homologue (T2) inhibits tumor necrosis factor-alpha in a species-specific fashion. *Virology* 204:692-705.

- Schreiber, M. y G. McFadden. 1996. Mutational analysis of the ligand-binding domain of M-T2 protein, the tumor necrosis factor receptor homologue of myxoma virus. *J Immunol* 157:4486-4495.
- Sedger, L.M., S.R. Osvath, X.M. Xu, G. Li, F.K. Chan, J.W. Barrett y G. McFadden. 2006. Poxvirus tumor necrosis factor receptor (TNFR)-like T2 proteins contain a conserved preligand assembly domain that inhibits cellular TNFR1-induced cell death. *J Virol* 80:9300-9309.
- Seet, B.T., J. Barrett, J. Robichaud, B. Shilton, R. Singh y G. McFadden. 2001. Glycosaminoglycan binding properties of the myxoma virus CC-chemokine inhibitor, M-T1. *J Biol Chem* 276:30504-30513.
- Seet, B.T. y G. McFadden. 2002. Viral chemokine-binding proteins. *J Leukoc Biol* 72:24-34.
- Smith, C.A., T. Davis, J.M. Wignall, W.S. Din, T. Farrah, C. Upton, G. McFadden y R.G. Goodwin. 1991. T2 open reading frame from the Shope fibroma virus encodes a soluble form of the TNF receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 176:335-342.
- Smith, C.A., F.Q. Hu, T.D. Smith, C.L. Richards, P. Smolak, R.G. Goodwin y D.J. Pickup. 1996. Cowpox virus genome encodes a second soluble homologue of cellular TNF receptors, distinct from CrmB, that binds TNF but not LT alpha. *Virology* 223:132-147.
- Smith, C.A., T.D. Smith, P.J. Smolak, D. Friend, H. Hagen, M. Gerhart, L. Park, D.J. Pickup, D. Torrance, K. Mohler, K. Schooley y R.G. Goodwin. 1997. Poxvirus genomes encode a secreted, soluble protein that preferentially inhibits beta chemokine activity yet lacks sequence homology to known chemokine receptors. *Virology* 236:316-327.
- Smith, G.L. y Y.S. Chan. 1991. Two vaccinia virus proteins structurally related to the interleukin-1 receptor y the immunoglobulin superfamily. *J Gen Virol* 72 (Pt 3):511-518.
- Smith, G.L. y B. Moss. 1983. Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA. *Gene* 25:21-28.
- Smith, P., R.E. Fallon, N.E. Mangan, C.M. Walsh, M. Saraiva, J.R. Sayers, A.N. McKenzie, A. Alami y P.G. Fallon. 2005. Schistosoma mansoni secretes a chemokine binding protein with antiinflammatory activity. *J Exp Med* 202:1319-1325.
- Spencer, J.V., K.M. Lockridge, P.A. Barry, G. Lin, M. Tsang, M.E. Penfold y T.J. Schall. 2002. Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10. *J Virol* 76:1285-1292.
- Spriggs, M.K. 1999. Shared resources between the neural y immune systems: semaphorins join the ranks. *Curr Opin Immunol* 11:387-391.
- Stanford, M.M., G. McFadden, G. Karupiah y G. Chaudhri. 2007. Immunopathogenesis of poxvirus infections: forecasting the impending storm. *Immunol Cell Biol* 85:93-102.
- Steed, P.M., M.G. Tansey, J. Zalevsky, E.A. Zhukovsky, J.R. Desjarlais, D.E. Szymkowski, C. Abbott, D. Carmichael, C. Chan, L. Cherry, P. Cheung, A.J. Chirino, H.H. Chung, S.K. Doberstein, A. Eivazi, A.V. Filikov, S.X. Gao, R.S. Hubert, M. Hwang, L. Hyun, S. Kashi, A. Kim, E. Kim, J. Kung, S.P. Martinez, U.S. Muchhal, D.H. Nguyen, C. O'Brien, D. O'Keefe, K. Singer, O. Vafa, J. Vielmetter, S.C. Yoder y B.I. Dahiyat. 2003. Inactivation of TNF signaling by rationally designed dominant-negative TNF variants. *Science* 301:1895-1898.
- Symons, J.A., A. Alami y G.L. Smith. 1995. Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure y broad species specificity. *Cell* 81:551-560.
- Symons, J.A., D.C. Tschärke, N. Price y G.L. Smith. 2002. A study of the vaccinia virus interferon-gamma receptor y its contribution to virus virulence. *J Gen Virol* 83:1953-1964.
- Tacke, F., D. Alvarez, T.J. Kaplan, C. Jakubzick, R. Spanbroek, J. Llodra, A. Garin, J. Liu, M. Mack, N. van Rooijen, S.A. Lira, A.J. Habenicht y G.J. Randolph. 2007. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5 y CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 117:185-194.
- Tak, P.P. y J.R. Kalden. 2011. Advances in rheumatology: new targeted therapeutics. *Arthritis Res Ther* 13 Suppl 1:S5.
- Tang, P., M.C. Hung y J. Klostergaard. 1996. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* 35:8216-8225.
- Tooze, J., M. Hollinshead, B. Reis, K. Radsak y H. Kern. 1993. Progeny vaccinia y human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur J Cell Biol* 60:163-178.
- Trinchieri, G. 1989. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47:187-376.
- Tsiodras, S., G. Samonis, D.T. Boumpas y D.P. Kontoyiannis. 2008. Fungal infections complicating tumor necrosis factor alpha blockade therapy. *Mayo Clin Proc* 83:181-194.
- Tsung, K., J.H. Yim, W. Marti, R.M. Buller y J.A. Norton. 1996. Gene expression y cytopathic effect of vaccinia virus inactivated by psoralen y long-wave UV light. *J Virol* 70:165-171.
- Tsuru, S., H. Kitani, M. Seno, M. Abe, Y. Zinnaka y K. Nomoto. 1983. Mechanism of protection during the early phase of a generalized viral infection. I. Contribution of phagocytes to protection against ectromelia virus. *J Gen Virol* 64 (Pt 9):2021-2026.
- Umeda, K., X. Sun, Y. Guo, H. Yamada, K. Shibata y Y. Yoshikai. 2011. Innate memory phenotype CD4+ T cells play a role in early protection against infection by Listeria monocytogenes in a CD30L-dependent manner. *Microbiol Immunol* 55:645-656.

- Upton, C., J.L. Macen, M. Schreiber y G. McFadden. 1991. Myxoma virus expresses a secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence. *Virology* 184:370-382.
- van Berkel, V., J. Barrett, H.L. Tiffany, D.H. Fremont, P.M. Murphy, G. McFadden, S.H. Speck y H.I. Virgin. 2000. Identification of a gammaherpesvirus selective chemokine binding protein that inhibits chemokine action. *J Virol* 74:6741-6747.
- Van Ostade, X., J. Tavernier y W. Fiers. 1994. Structure-activity studies of human tumour necrosis factors. *Protein Eng* 7:5-22.
- Verardi, P.H., L.A. Jones, F.H. Aziz, S. Ahmad y T.D. Yilma. 2001. Vaccinia virus vectors with an inactivated gamma interferon receptor homolog gene (B8R) are attenuated In vivo without a concomitant reduction in immunogenicity. *J Virol* 75:11-18.
- Viejo-Borbolla, A., A.P. Martin, L.R. Muniz, L. Shang, F. Marchesi, N. Thirunarayanan, N. Harpaz, R.A. Garcia, M. Apostolaki, G.C. Furtado, L. Mayer, G. Kollias, A. Alcami y S.A. Lira. 2010a. Attenuation of TNF-driven murine ileitis by intestinal expression of the viral immunomodulator CrmD. *Mucosal Immunol* 3:633-644.
- Viejo-Borbolla, A., N. Martinez-Martin, H.J. Nel, P. Rueda, R. Martin, S. Blanco, F. Arenzana-Seisdedos, M. Thelen, P.G. Fallon y A. Alcami. 2012. Enhancement of chemokine function as an immunomodulatory strategy employed by human herpesviruses. *PLoS Pathog* 8:e1002497.
- Viejo-Borbolla, A., A. Munoz, E. Tabares y A. Alcami. 2010b. Glycoprotein G from pseudorabies virus binds to chemokines with high affinity y inhibits their function. *J Gen Virol* 91:23-31.
- Vujanovic, N.L. 2011. Role of TNF superfamily ligands in innate immunity. *Immunol Res* 50:159-174.
- Wallach, D., E.E. Varfolomeev, N.L. Malinin, Y.V. Goltsev, A.V. Kovalenko y M.P. Boldin. 1999. Tumor necrosis factor receptor y Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 17:331-367.
- Wang, D., W. Bresnahan y T. Shenk. 2004. Human cytomegalovirus encodes a highly specific RANTES decoy receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16642-16647.
- Wang, Y., G. Chaudhri, R.J. Jackson y G. Karupiah. 2009. IL-12p40 y IL-18 play pivotal roles in orchestrating the cell-mediated immune response to a poxvirus infection. *J Immunol* 183:3324-3331.
- Ware, C.F. 2009. Targeting the LIGHT-HVEM pathway. *Adv Exp Med Biol* 647:146-155.
- Webb, L.M., V.P. Smith y A. Alcami. 2004. The gammaherpesvirus chemokine binding protein can inhibit the interaction of chemokines with glycosaminoglycans. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18:571-573.
- Wong, G.H. y D.V. Goeddel. 1986. Tumour necrosis factors alpha y beta inhibit virus replication y synergize with interferons. *Nature* 323:819-822.
- Wong, M., D. Ziring, Y. Korin, S. Desai, S. Kim, J. Lin, D. Gjertson, J. Braun, E. Reed y R.R. Singh. 2008. TNFalpha blockade in human diseases: mechanisms y future directions. *Clin Immunol* 126:121-136.
- Xiang, Y. y B. Moss. 1999. IL-18 binding y inhibition of interferon gamma induction by human poxvirus-encoded proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11537-11542.
- Xu, J., A.K. Chakrabarti, J.L. Tan, L. Ge, A. Gambotto y N.L. Vujanovic. 2007a. Essential role of the TNF-TNFR2 cognate interaction in mouse dendritic cell-natural killer cell crosstalk. *Blood* 109:3333-3341.
- Xu, R.H., M. Cohen, Y. Tang, E. Lazear, J.C. Whitbeck, R.J. Eisenberg, G.H. Cohen y L.J. Sigal. 2008. The orthopoxvirus type I IFN binding protein is essential for virulence y an effective target for vaccination. *J Exp Med* 205:981-992.
- Xu, R.H., M. Fang, A. Klein-Szanto y L.J. Sigal. 2007b. Memory CD8+ T cells are gatekeepers of the lymph node draining the site of viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10992-10997.
- Xu, R.H., D. Rubio, F. Roscoe, T.E. Krouse, M.E. Truckenmiller, C.C. Norbury, P.N. Hudson, I.K. Damon, A. Alcami y L.J. Sigal. 2012. Antibody inhibition of a viral type 1 interferon decoy receptor cures a viral disease by restoring interferon signaling in the liver. *PLoS Pathog* 8:e1002475.
- Xue, X., Q. Lu, H. Wei, D. Wang, D. Chen, G. He, L. Huang, H. Wang y X. Wang. 2011. Structural basis of chemokine sequestration by CrmD, a poxvirus-encoded tumor necrosis factor receptor. *PLoS Pathog* 7:e1002162.
- Yang, Z., A.P. West, Jr. y P.J. Bjorkman. 2009. Crystal structure of TNFalpha complexed with a poxvirus MHC-related TNF binding protein. *Nat Struct Mol Biol* 16:1189-1191.
- Yokoyama, W.M. 2005. Natural killer cell immune responses. *Immunol Res* 32:317-325.
- Yoon, H.J., M.E. Moon, H.S. Park, S.Y. Im y Y.H. Kim. 2007. Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells. *Biochem Biophys Res Commun* 358:954-959.
- Yoshimoto, T., H. Okamura, Y.I. Tagawa, Y. Iwakura y K. Nakanishi. 1997. Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3948-3953.
- Yu, M., W. Shi, J. Zhang, L. Niu, Q. Chen, D. Yan, T. Liu, W. Jing, X. Jiang, F. Wei, B. Yin, W. Zhang, Q. Li y Z. Li. 2009. Influence of reverse signaling via membrane TNF-alpha on cytotoxicity of NK92 cells. *Eur J Cell Biol* 88:181-191.

- Zaballos, A., J. Gutierrez, R. Varona, C. Ardavin y G. Marquez. 1999. Cutting edge: identification of the orphan chemokine receptor GPR-9-6 as CCR9, the receptor for the chemokine TECK. *J Immunol* 162:5671-5675.
- Zalevsky, J., T. Secher, S.A. Ezhevsky, L. Janot, P.M. Steed, C. O'Brien, A. Eivazi, J. Kung, D.H. Nguyen, S.K. Doberstein, F. Erard, B. Ryffel y D.E. Szymkowski. 2007. Dominant-negative inhibitors of soluble TNF attenuate experimental arthritis without suppressing innate immunity to infection. *J Immunol* 179:1872-1883.
- Zhang, L., M. Derider, M.A. McCornack, S.C. Jao, N. Isern, T. Ness, R. Moyer y P.J. LiWang. 2006a. Solution structure of the complex between poxvirus-encoded CC chemokine inhibitor vCCI y human MIP-1beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13985-13990.
- Zhang, L., R. Lawrence, B.A. Frazier y J.D. Esko. 2006b. CHO glycosylation mutants: proteoglycans. *Methods Enzymol* 416:205-221.
- Zheng, F., N. Liu, Q. Chen, L. Yang, L. Liu, P. Xiong, W. Feng, X. Jiang, F. Gong y Z. Li. 2009. Leader sequence is required for activity of transmembrane tumor necrosis factor-alpha. *Mol Immunol* 46:3336-3344.
- Zou, G.M., W.Y. Hu y W. Wu. 2007. TNF family molecule LIGHT regulates chemokine CCL27 expression on mouse embryonic stem cell-derived dendritic cells through NF-kappaB activation. *Cell Signal* 19:87-92.